

# **Untersuchungen zur Antikörperprävalenz von Influenza A und B bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland mittels differenten Enzyme-linked Immunosorbent Assays**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von:	<b>Tobias Langenhan</b>
geboren am:	<b>31.03.1987</b>
in:	<b>Hildburghausen</b>

Erster Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Sauerbrei, Jena
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Wolfgang Pfister, Jena
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Barbara Gärtner, Homburg/Saar

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.Februar 2015

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ch.-B.	Chargenbezeichnung
CI	Konfidenzintervall
CIO	Konfidenzintervall-obere Grenze
CIU	Konfidenzintervall-untere Grenze
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
d.h.	das heißt
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
fn	Falsch Negative
fp	Falsch Positive
HA	Hämagglutinin
HAHT	Hämagglutinationshemmtest
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
I.E.	Internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVA	Influenzavirus A
IVB	Influenzavirus B
J.	Jahre
KBR	Komplementbindungsreaktion
LAIV	attenuierter Influenza-Lebendimpfstoff
min	Minuten
MP	Matrixprotein
MRP	Meerrettich-Peroxidase
MW	Mittelwert

n	Anzahl der Seren / Probanden
NA	Neuraminidase
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NPV	Negativer prädiktiver Vorhersagewert
NS	Nichtstrukturprotein
NTU	NovaTec Units
OD	optische Dichte
PA	RNA-Polymerase
PB	Polymerase-bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDZ-Domäne	Proteininteraktions-Domäne
PPV	Positiver prädiktiver Vorhersagewert
rn	Richtig Negative
RNP	Ribonukleoprotein
rp	Richtig Positive
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SA	Sialinsäure
SK	Standardkurve
STIKO	Ständige Impfkommision des Robert Koch-Instituts
TMB	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin
Vk%	Variationskoeffizient
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

## Begriffsverzeichnis

Diagnostische Sensitivität	Wahrscheinlichkeit des Tests, ein positives Ergebnis bei Vorhandensein des spezifischen Analyten zu liefern (auch: Empfindlichkeit; Trefferquote). Sie gibt den Anteil der korrekt als positiv klassifizierten Objekte an der Gesamtheit der tatsächlich positiven Objekte an (Sensitivität = $rp / rp+fn$ ).
Diagnostische Spezifität	Wahrscheinlichkeit des Tests, ein negatives Ergebnis bei Fehlen des spezifischen Analyten zu liefern. Sie gibt den Anteil der korrekt als negativ klassifizierten Objekte an der Gesamtheit der in Wirklichkeit negativen Objekte an (Spezifität = $rn / rn+fp$ ).

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	<b>Influenzavirus</b>	<b>3</b>
2.1.1	Taxonomie und Nomenklatur	3
2.1.2	Aufbau und Replikationszyklus	3
2.1.3	Variabilität	7
2.1.4	Pathogenität und Immunologie	8
2.1.5	Epidemiologie	9
2.2	<b>Influenza („Grippe“) als Infektionskrankheit des Menschen</b>	<b>10</b>
2.2.1	Bedeutung	10
2.2.2	Übertragung	11
2.2.3	Klinik	11
2.2.4	Diagnostik	13
2.2.5	Therapie und Prophylaxe	18
2.3	<b>Influenzaschutzimpfung</b>	<b>21</b>
2.3.1	Allgemeines	21
2.3.2	Aktuelle Impfeempfehlungen für Deutschland	21
2.3.3	Impfstoffklassen	22
2.3.4	Influenza-Infektionen und Schutzimpfung bei Kindern und Jugendlichen	23
2.3.5	Bestimmung der Seroprävalenz von Influenza A und B	25
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>28</b>
4.1	<b>Probanden und Untersuchungsmaterial</b>	<b>28</b>
4.1.1	Studiengruppe	28
4.1.2	Kontrollgruppe	29
4.2	<b>Qualitative und semiquantitative Bestimmung von Influenza A- und B-spezifischem Immunglobulin G</b>	<b>30</b>
4.2.1	Testprinzip des indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay	30
4.2.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay von NovaTec	32
4.2.3	Enzyme-linked Immunosorbent Assay von Euroimmun	38
4.2.4	Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IBL	42
4.3	<b>Statistische Methoden</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
5.1	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay von NovaTec</b>	<b>49</b>
5.1.1	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A	49
5.1.2	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A	52

5.1.3	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B .....	53
5.1.4	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B .....	56
5.2	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay von Euroimmun.....</b>	<b>58</b>
5.2.1	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A.....	58
5.2.2	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A.....	60
5.2.3	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B.....	62
5.2.4	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B .....	65
5.3	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IBL.....</b>	<b>67</b>
5.3.1	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A.....	67
5.3.2	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A.....	70
5.3.3	Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B.....	72
5.3.4	Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B.....	75
5.4	<b>Vergleich der Influenzavirus A- und B-Seroprävalenzen der Studiengruppe hinsichtlich des Impfstatus.....</b>	<b>77</b>
5.5	<b>Zusammenfassende Darstellung der Seroprävalenzen und der semiquantitativen Antikörperbefunde .....</b>	<b>81</b>
5.6	<b>Korrelationen der Enzyme-linked Immunosorbent Assays .....</b>	<b>83</b>
6	<b>Diskussion .....</b>	<b>85</b>
6.1	<b>Vergleich und Evaluation der Enzyme-linked Immunosorbent Assays</b>	<b>85</b>
6.2	<b>Seroprävalenzergebnisse der Influenza A und B .....</b>	<b>96</b>
7	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>105</b>
8	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
9	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>125</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>126</b>

## 1 Zusammenfassung der Arbeit

Die Influenza, insbesondere durch Viren des Typs A, gilt als eine der größten Bedrohungen der öffentlichen Gesundheit mit jährlich über einer Milliarde Infizierten weltweit. Ein besonders hohes Risiko für schwere Krankheitsverläufe besteht bei älteren Personen über 60 Jahren, Personen mit chronischen Erkrankungen sowie bei Kindern und Jugendlichen. Letztere weisen die höchsten Infektionsraten während Epidemien auf und gelten somit als Hauptüberträger der Influenza. Die Influenzaschutzimpfung stellt aktuell die wirksamste prophylaktische Maßnahme gegen die Influenza dar. Eine allgemeine Schutzimpfung für Kinder und Jugendliche wird in Deutschland nicht empfohlen.

Ziel der Arbeit war die Ermittlung der Prävalenz Influenzavirus A (IVA)- und Influenzavirus B (IVB)-spezifischer, subtypenunabhängiger Immunglobulin G (IgG)-Antikörper bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 17 Jahren in Deutschland mittels kommerziell vertriebener Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL. Die Studiengruppe setzte sich aus 1.665 Serumroben von 8 Kinderkliniken und einem diagnostischem Zentrum zusammen. Als Kontroll- bzw. Vergleichsgruppe dienten 400 Blutspender aus Hannover und Münster im Alter von 18 bis 65 Jahren. Ausgangspunkt war die qualitative und semiquantitative Bestimmung virusspezifischer IgG-Antikörper. Dabei sollte aufgezeigt werden, inwieweit sich die Assays zur Seroprävalenzbestimmung eignen und wie stark die einzelnen Tests miteinander korrelieren. Darüber hinaus war die Seroprävalenz in Abhängigkeit von der Herkunft der Kinder bzw. Jugendlichen und deren Impfstatus zu ermitteln. Auch Vergleiche von Antikörperprävalenz und Antikörperkonzentration zwischen den Alters- und Geschlechtsgruppen der Studiengruppe sowie zwischen Studien- und Kontrollgruppe sollten vorgenommen werden.

Im Ergebnis konnten für die einzelnen IVA-IgG-ELISAs Gesamtseroprävalenzen der Studien- und Kontrollgruppe ermittelt werden, die deutliche Unterschiede im Vergleich zeigten: Euroimmun 61,8%, NovaTec 70,3% und IBL 89,3%. Die IVB-IgG-ELISAs wiesen hinsichtlich der Gesamtseroprävalenz sogar noch deutlich größere Diskrepanzen auf: NovaTec 10,0%, IBL 42,5% und Euroimmun 56,9%. Diese Unterschiede bestanden ebenso bei den mittleren Antikörperkonzentrationen von Studien- und Kontrollgruppe: NovaTec 17,58 NTU/ml, Euroimmun 59,83 RE/ml und IBL 62,07 U/ml für IVA; NovaTec 4,73 NTU/ml, IBL 18,41 U/ml und Euroimmun 67,70 RE/ml für IVB. Für alle eingesetzten ELISAs waren die Seroprävalenzen bei Geimpften



signifikant höher als bei Ungeimpften ( $p < 0.05$ ). Im Vergleich der einzelnen IVA- bzw. IVB-IgG-ELISAs untereinander mittels Kappa-Test ergaben sich nur geringe Korrelationen ( $\text{kappa} \leq 0.4$ ). Lediglich für die IVB-IgG-ELISAs von Euroimmun und IBL war eine gute Übereinstimmung festzustellen ( $\text{kappa} = 0.716$ ).

Aufgrund von Analysen zur Sensitivität und Kreuzreaktivität sowie von Literaturvergleichen wurden zur Dokumentation der IVA-Seroprävalenz der ELISA von IBL und für die IVB-Seroprävalenz der ELISA von Euroimmun verwendet. Die Seroprävalenz der Influenza A betrug 87,6% innerhalb der Studiengruppe der Kinder und Jugendlichen und 96,3% bei der Erwachsenen-Kontrollgruppe. In der Studiengruppe stieg die Seroprävalenz signifikant mit dem Alter an. Kinder im Alter von 0-6 Jahren hatten eine signifikant niedrigere und Kinder im Alter von 13-14 Jahren eine signifikant höhere Seroprävalenz als die erwachsenen Kontrollen. Die mittlere Antikörperkonzentration lag in der Studiengruppe bei 59,95 U/ml, in der Kontrollgruppe bei 72,02 U/ml. Die Konzentration stieg signifikant bis zum Alter von 17 Jahren. Die mittlere Antikörperkonzentration war bei 0- bis 6-Jährigen signifikant niedriger und bei 11- bis 17-Jährigen signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Seroprävalenz für Influenza B betrug 47% innerhalb der Studiengruppe und 98% bei den Kontrollprobanden. Sowohl in der Studien- als auch der Kontrollgruppe stieg die Seroprävalenz signifikant mit dem Alter. Die Seroprävalenz war bei Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen signifikant niedriger als in der Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen. Es wurden auch deutliche regionale Differenzen bezüglich der IVB-Seroprävalenz festgestellt. Die mittlere Antikörperkonzentration lag in der Studiengruppe bei 54,67 RE/ml, in der Kontrollgruppe bei 119,31 RE/ml. Die Konzentration stieg signifikant bis zum Alter von 17 Jahren und war in der Studiengruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ).

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass der Einsatz von ELISAs für die Detektion subtypenunabhängiger IVA-/IVB-spezifischer IgG-Antikörper eine sensitive und kostengünstige Methode darstellt, die für große Seroprävalenzstudien geeignet ist. Allerdings zeigen kommerziell vertriebene IVA- und IVB-IgG-ELISAs große Differenzen hinsichtlich ihrer Sensitivität. Aus diesem Grunde sollten diese Tests vor ihrem Einsatz evaluiert werden. Die ermittelten Influenza-Seroprävalenzen ermöglichen Schlussfolgerungen für die Durchführung der Influenzaschutzimpfung im Kindesalter.

## 2 Einleitung

### 2.1 Influenzavirus

#### 2.1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae. Zu dieser Familie zählen neben den Influenza A-, B- und C-Viren noch die Thogoviren und Isaviren. Für den Menschen sind nur IVA und IVB pathogen und damit von epidemiologischem Interesse. Die wesentlichen antigenen Determinanten von IVA und IVB sind die transmembranen Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Anhand der Antigenität dieser Glykoproteine wird IVA weiter unterteilt in sechzehn HA (H1-H16)- und in neun NA (N1-N9)-Subtypen. Die vollständige Nomenklatur eines isolierten Virus erfordert Angaben über den Subtyp (A oder B), die Spezies des Wirtsorganismus (kann bei Isolierung vom Menschen weggelassen werden), die geographische Lage, eine Seriennummer, das Jahr der Isolation und zuletzt die HA- und NA-Varianten in Klammern, z.B.: A/Gans/Guangdong/1/96/(H5N1). Beim IVB gibt es keine Subtypen, aber seit Jahren zirkulieren weltweit zwei genetisch unterschiedliche Linien, die Yamagata-Linie und die Victoria-Linie. Diese Unterscheidung bezieht sich, wie bei den IVA-Subtypen, auf die Oberflächenproteine [Kamps et al. 2006, Robert Koch-Institut. 2011].

#### 2.1.2 Aufbau und Replikationszyklus

##### Virion

Alle Virusgattungen stellen sich unter dem Transmissionselektronenmikroskop als kugelige oder ellipsoide umhüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von 80-120 nm dar [Lamb und Choppin. 1983]. Innerhalb der Lipidhülle, die das Ribonukleoprotein (RNP) des Virions umgibt, ist eine variable Anzahl von Membranproteinen eingelagert: HA, NA und Matrixprotein (MP) 2 bei IVA. Das RNP besitzt eine helikale Symmetrie und ist ein Komplex aus dem Virusgenom, den strukturellen Proteinen MP und Nukleoprotein (NP) und den replikationsrelevanten Proteinen RNA-Polymerase (PA), Polymerase-bindenden Proteinen (PB) 1 und 2. Die Glykoproteine HA und NA ragen als 10-14 nm lange Spikes oder Peplomere genannte Fortsätze über die Virusoberfläche hinaus. Dagegen ragt das MP 2 von IVA nur mit 24 Aminosäuren aus der Lipiddoppelschicht heraus und wird unter der Überdeckung des HA und NA kaum

von Antikörpern im Zuge einer Immunreaktion erkannt [Klenk. 2010]. Ein 3D-Modell des Aufbaus eines Influenzaviruspartikels zeigt Abb.1.

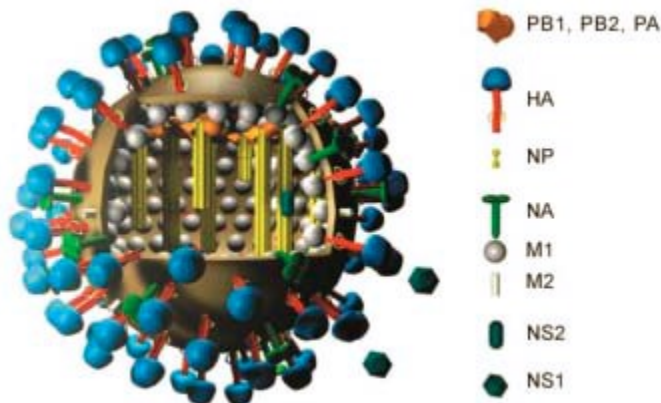


Abb.1: 3D-Modell des Influenzavirus [Kamps et al. 2006]. Von: Dr. Markus Eickmann, Institut für Virologie, Marburg, Deutschland. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

## Genom

Das Virusgenom der Influenzaviren besteht aus acht vorwiegend einzelsträngig vorliegenden RNA-Segmenten (bei Influenza C nur sieben) mit negativer Polarität. Die Segmentierung des Genoms ist auch für die erhebliche Steigerung der genetischen Variabilität der Influenzaviren über die Fähigkeit zur genetischen Reassortierung verantwortlich, da bei einer Superinfektion einer Zelle mit einem anderen Influenzastamm ein Austausch der Segmente erfolgen kann. Durch das RNA-basierte einzelsträngige Genom kommen häufig Punktmutationen vor, denn die RNA-Polymerasen von RNA-Viren besitzen keine Exonuklease-Funktion zur Korrektur von Kopierfehlern. Durch beide Mechanismen entstehen „Fluchtmutationen“ zur Umgehung der Immunantwort, während die Funktionen des Virions erhalten bleiben sollen. Das Genom erhält die stärkste Anpassung durch den vom Immunsystem ihrer Reservoirwirte erzeugten Selektionsdruck, wobei der Erhalt der Proteinfunktionen für eine hohe Reproduktions- und Infektionsrate notwendig ist [Klenk. 2010, Lamb und Choppin. 1983, Kamps et al. 2006].

Die acht verschiedenen Segmente HA, NA, MP, NP, PA, PB 1, PB 2 und das Nichtstrukturprotein (NS) kodieren bei IVA bis zu elf virale Proteine: das HA, die NA, das NP, die MP 1 und 2, die RNA-Polymerase, die Polymerase-bindenden Proteine PB 1, PB 2 und vereinzelt auch PB 1-F 2 sowie die Nichtstrukturproteine NS 1 und NS 2 [König et al. 2010].

## **Funktionen der einzelnen Proteine**

### Hämagglutinin (HA)

Das HA bewirkt die Verklumpung, auch Agglutination genannt, von Erythrozyten und vermittelt die Anheftung des Virions an die Wirtszelle bei der Infektion. Letzteres geschieht durch Anlagerung des HA-Moleküls an Sialinsäuren (SA) auf Proteinen der Wirtszellhülle, sogenannten SA-Rezeptoren. Durch die unterschiedliche Verknüpfung der SA bei Vögeln, bei denen SA meist  $\alpha$ -2,3-verknüpft ist, und Säugern, bei denen SA meist  $\alpha$ -2,6-verknüpft ist, sowie der unterschiedlichen Verteilungen dieser Verknüpfungen in der Lunge passt nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip nur eine bestimmte HA-Variante an einen definierten Wirtszellrezeptor. Jeder Wirt verfügt dabei nur über einen Teil aller von Influenzaviren genutzten Rezeptoren, was der Grund für die Wirtsspezifität bestimmter Subtypen des Virus ist [Zhi-Yong Yang et al. 2007, Yao et al. 2008]. Nach proteolytischer Aktivierung durch zelluläre Serinproteasen bewirkt das HA eine Fusion des Virions mit der endosomalen Membran des Wirts und die Freisetzung des RNP ins Zytosol [Klenk.2010].

### Neuraminidase (NA)

Die NA hat eine enzymatische Funktion. Sie dient der Abspaltung der SA durch Hydrolyse an zellulären Rezeptoren. Dadurch erfolgt die Freisetzung der in den Wirtszellen neu replizierten Viren und damit die Ausbreitung der Infektion [Suzuki. 2005]. Weiterhin verhindert sie ein HA-vermitteltes Anheften der Tochterviren an bereits infizierte Zellen und den Start eines Zelltodprogramms. Zusätzlich hemmt die NA die Interferonbildung und blockt damit eine adäquate Immunantwort des infizierten Organismus [Kamps et al. 2006].

### Matrixprotein 2 (MP 2)

Beim IVA ist MP 2 ein Protonenkanal, der zur Ansäuerung des Inneren des Virions nach Endozytose dient, um die Fusionsdomäne des HA zu aktivieren. Dies führt dann zur Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran und zur Freisetzung des RNP. Beim IVB ist MP 2 kein Hüllprotein, sondern ein lösliches Protein, bestehend aus 109 Aminosäuren [Lindstrom. 1999].

### Matrixprotein 1 (MP 1)

Das MP 1 verbindet die Virusmembran mit dem RNP.

Ribonukleoprotein (RNP)

Das RNP ist ein Komplex aus NP, den viralen RNA-Segmenten und dem für die Replikation und Translation verantwortlichen Polymerase-Komplex aus PA, PB 1 und PB 2. Das NP bindet dabei an die virale RNA und vermittelt über ein Kernlokalisierungssignal den Transport in den Zellkern [Martin und Helenius. 1991].

Regulatorische Nichtstrukturproteine (NS)

Das NS 1 mindert durch seine Bindung an PDZ-Domänen die Interferon-Reaktion des Wirtes und somit die Immunreaktion [Haye et al. 2009]. Weiterhin verhindert NS 1 das Ausschleusen wirtseigener mRNA aus dem Zellkern durch Bindung ihrer Cap-Struktur, wodurch die virale RNA vermehrt in Proteine translatiert wird [Hale et al. 2008]. Das NS 2 vermittelt den Export viraler mRNA aus dem Zellkern [Robb. 2009].

**Replikationszyklus**

Der Replikationsort der Influenzaviren ist der Respirationstrakt des Menschen, wobei humane Grippeviren Zellen des Flimmerepithels als Wirtszellen bevorzugen, aviäre Influenzaviren hingegen hauptsächlich Darmepithelzellen.

Die NA verhindert ein Verkleben mit den Muzinen des Respirationsssekretes. Nach der Bindung des HA an eine N-Acetyl-Neuraminsäure, die als SA-Rezeptor dient, auf der Zelloberfläche erfolgt die Einstülpung des Virions durch rezeptorvermittelte Endozytose (Adsorption und Penetration, s. Abb. 2: Schritt 1). Das Virion liegt also nunmehr in einem Endosom des Wirts vor. Zelluläre Serinproteasen spalten nun das HA in HA 1 und HA 2. Das aktivierte HA 2 und die Ansäuerung des Virions durch das Ionenkanalprotein MP 2 führen zur Verschmelzung von Virus- mit Endosomenmembran und somit zur Freisetzung des RNP ins Zytosol der Wirtszelle. Das MP 1 wird daraufhin vom Nukleokapsid abgespalten und die virale RNA in den Zellkern geschleust, wobei es zu einer Interaktion des NP mit Transportproteinen der Wirtszelle, der sogenannten Kernlokalisierungssequenz, kommt (Uncoating, s. Abb. 2: Schritt 2). Die Erstellung viraler RNA erfolgt durch den viralen Polymerasekomplex unter Verwendung der Ribonukleotide des Wirts (Genomreplikation, s. Abb. 2: Schritt 3a und 3b). Neu synthetisierte mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und dort an den Ribosomen in die viralen Proteine translatiert (Translation, s. Abb. 2: Schritt 4). Die posttranslationale Prozessierung von HA, NA und MP 2 beinhaltet auch den Transport dieser viralen Hüllproteine via Golgi-Apparat in die Zellmembran der

Wirtszelle (Prozessierung, s. Abb. 2: Schritt 5b). Die Proteine NP, MP 1, NS 1 und NS 2 wandern in den Zellkern und binden die neu synthetisierten viralen RNA-Kopien (Assemblierung, s. Abb. 2: Schritt 5a). Die neu formierten Nukleokapside werden dann in einem NS 2-abhängigen Prozess zum Ort der Zellmembran transportiert, in dem HA, NA und MP 2 integriert sind (Assemblierung, s. Abb. 2: Schritt 6). Nun werden die Tochterviren aus der Zelle freigesetzt, indem NA die SA-Rezeptoren zerstört (Liberation, s. Abb. 2: Schritt 7) [Klenk. 2010, Kamps et al. 2006]. Influenzaviren sind lytische Viren und verlassen die Wirtszelle durch Zerstörung ebendieser. In einer einzigen Wirtszelle können sich bis zu 100.000 neue Influenzaviren bilden, bevor diese dann abstirbt und anschließend die freigesetzten Viren weitere Nachbarzellen infizieren. Diese produzieren dann ebenfalls jeweils hunderttausende neue Viren. So erklärt sich auch die Schnelligkeit, mit der sich in der Regel diese virale Infektion im Körper eines Betroffenen ausbreitet.

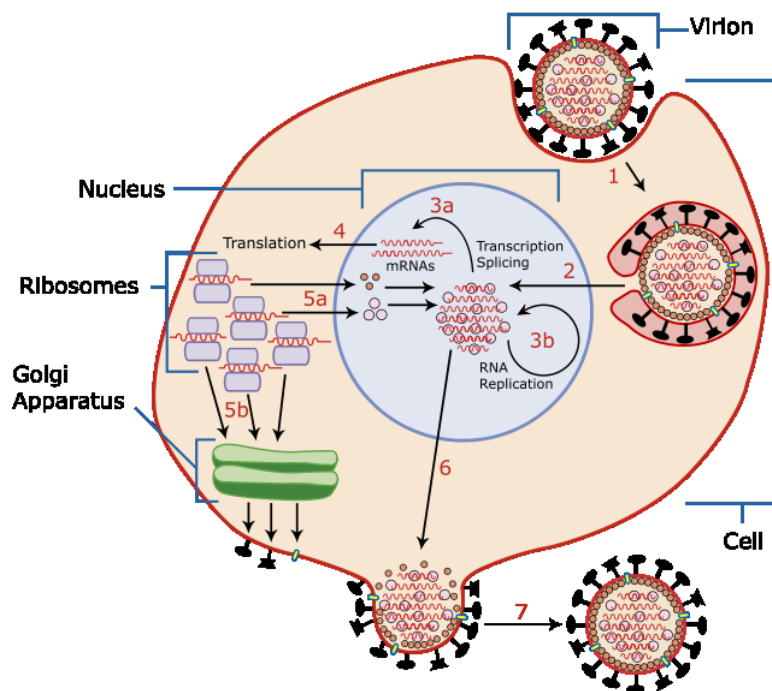


Abb. 2: Schema des Replikationszyklus von Influenzaviren. Link: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Virus\\_Replication.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Virus_Replication.svg).

### 2.1.3 Variabilität

#### Antigendrift

Sukzessive auftretende Punktmutationen in den Nukleotiden in den für die beiden Glykoproteine HA und NA kodierenden Bereichen können eine Änderung der Oberflächenantigene des Grippevirus bewirken. Menschliche Antikörper können

immer nur eine solche Variante erkennen. Diese eher kleinen Veränderungen sind der Grund dafür, dass ein Mensch mehrmals in seinem Leben mit einer anderen nur geringfügig veränderten Virusvariante infiziert werden kann und dass sowohl Epidemien wie regional begrenzte Ausbrüche regelmäßig wiederkehren [Klenk. 2010].

### Antigen shift

Wird ein Organismus gleichzeitig von zwei Virusvarianten infiziert, so kann es zu einer Neuzusammenstellung unter den zweimal acht Genomsegmenten der beteiligten Influenzaviren kommen. Dabei werden einzelne oder mehrere RNA-Moleküle zwischen den Influenzaviren in einer doppelt infizierten Zelle ausgetauscht. Dies wird als genetisches Reassortment bezeichnet und kann sowohl im Menschen, aber auch in anderen Wirten, vor allem aber bei Vögeln und Schweinen erfolgen. Die so verursachten größeren Veränderungen in den viralen Oberflächenantigenen werden allein bei IVA beobachtet, kommen allerdings nur selten vor. Derartige Shiftvarianten können dann der Ursprung von Pandemien sein, da diese neuen Virusvarianten auf eine immunologisch völlig naive humane Bevölkerung treffen. Beispiele solcher Pandemien sind die „Spanische Grippe“ H1N1 1918-19, die „Asiatische Grippe“ H2N2 1957, die „Hong-Kong-Grippe“ H3N2 1968, die „Russische Grippe“ H1N1 1977 sowie die „Schweinegrippe“ H1N1pdm09 2009 [Klenk. 2010].

### **2.1.4 Pathogenität und Immunologie**

Hinsichtlich der Pathogenität der Influenzaviren und deren Subtypen gibt es große Unterschiede hinsichtlich Organotropismus und Schweregrad der Erkrankung. Während Influenzaviren des Menschen und des Säugers pneumotrop sind, führen aviäre Influenzaviren bei Vögeln fast immer zu systemischen Infektionen mit meist letalem Ausgang. Pathogenitätsfaktoren sind die Vermehrungseffizienz, der Gewebstropismus, die Infektionsausbreitung und die Empfindlichkeit des Virus gegenüber Abwehrmechanismen des Wirts. Der Immunstatus der Bevölkerung und die Antigenunterschiede zwischen den verschiedenen Influenza-Subtypen sind die wesentlichen Ursachen dafür, dass neue pandemische Viren in der Regel zu schwereren Verlaufsformen führen als inter pandemische Erreger. Eine entscheidende Rolle zur Pathogenität von Influenzaviren hat die proteolytische Aktivierung von HA inne. Hierbei lassen sich die Erreger in 2 Gruppen einteilen. Ist das HA des Virus durch in allen Geweben vorkommende Proteinkonvertasen spaltbar, so kommt es zumeist

zu einem systemischen, schweren Verlauf mit häufig auch letalem Ausgang. Besitzt das Virus jedoch ein HA, das nur durch Proteinkonvertasen bestimmter Körpergewebe spaltbar ist wie z.B. Tryptase Clara in Lungenepithelien, so besitzt dieser Virus-Subtyp eine geringere Pathogenität. Auch bestimmte Bakterien sezernieren HA-aktivierende Proteasen wie etwa *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* oder *Haemophilus influenzae* B. Deshalb kommt es bei Koinfektionen mit einem dieser Erreger zu besonders schweren Krankheitsverläufen [Klenk. 2010]. Ein entscheidender Pathogenitätsfaktor der Influenzaviren ist ihre große genetische Variabilität durch Antigendrift und Antigen shift, mit deren Hilfe sich die Viren ständig der Immunantwort des Wirtes entziehen können.

Die Umweltstabilität der Influenzaviren ist stark von der Temperatur abhängig. Bei ca. 20°C überleben an Oberflächen angetrocknete Viren etwa zwei bis acht Stunden, in Geweben verstorbener Tiere, in Exkrementen und in Wasser mindestens vier Tage. Bei Temperaturen von 0°C überstehen die Partikel mehr als 30 Tage, im Eis sind sie nahezu unbegrenzt überdauerungsfähig. Oberhalb von 22°C nimmt die Umweltstabilität ab. Ab 70°C verliert das Virus seine Infektiosität [Polozov et al. 2008]. Die behüllten Influenzaviren sind außerdem empfindlich gegenüber Detergenzien und organischen Lösungsmitteln wie z.B. Ethanol und Isopropanol. Eine chemische Denaturierung führt zum Funktionsverlust der viralen Proteine [Abe et al. 2007, Grayson et al. 2009].

Die Oberflächen-Glykoproteine HA und NA sind die Träger von subtyp- und stammspezifischer Antigendeterminanten, die zur Bildung einer zum Schutz führenden Immunität beitragen. Zur Bildung neutralisierender Antikörper kommt es durch Epitope des HA. Neuraminidase-spezifische Antikörper hemmen lediglich die Ausschleusung neuer Viruspartikel aus der Zelle und damit deren Ausbreitung. Das MP und NP zeigen typspezifische Antigenität und erlauben die serologische Differenzierung in IVA sowie IVB [Klenk. 2010]. Sie sprechen bei Anwesenheit von Antikörpern gegen diese Antigene für eine bestimmte T-Zell-Immunität [Cinatl et al. 2007].

### 2.1.5 Epidemiologie

Für die Epidemiologie der Influenzaviren ist die hohe genetische Variabilität von grundlegender Bedeutung, die besonders beim IVA mit seinem breiten Wirtsspektrum und seiner Vielzahl an HA- und NA-Subtypen beobachtet wird. Beim Mensch, Schwein, Pferd und anderen Säugern zirkulieren nur ein Teil dieser Subtypen,



wohingegen bei Vögeln das gesamte Spektrum vorkommt. Bei IVB findet keine Subtypenunterscheidung statt, und der Mensch gilt als einziger Wirt. Influenzaviren und die durch sie ausgelösten Erkrankungen beim Menschen existieren weltweit [Klenk. 2010]. In gemäßigten Klimazonen zirkulieren die Viren saisonal von November bis April auf der Nordhalbkugel, von April bis November auf der Südhalbkugel und in den Tropen ganzjährig.

## **2.2 Influenza („Grippe“) als Infektionskrankheit des Menschen**

### **2.2.1 Bedeutung**

Die durch IVA und IVB übertragene Influenza, im Volksmund auch als „Grippe“ bezeichnet, gilt als eine der größten Bedrohungen der öffentlichen Gesundheit mit jährlich über einer Milliarde Infizierten weltweit. Davon erkranken etwa fünf Millionen schwer, und bis zu 500.000 Infektionen verlaufen letal [Palache. 2009]. Jährlich sind nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 10-20% der Weltbevölkerung betroffen. Die Arbeitsgemeinschaft Influenza veröffentlicht unter der Federführung des Robert Koch-Instituts jährlich einen Saison-Abschlussbericht, in dem die jeweiligen statistischen Jahresdaten des Verlaufes der Erkrankung in Deutschland festgehalten sind (Link: <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>). Auch aktuelle wöchentliche Berichte sind unter vorangegangenen Link zu finden. Epidemiologische Daten für Europa werden durch das European Influenza Surveillance Network (EISN) erhoben (Link: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EISN/Pages/index.aspx>).

Weltweit gefürchtet sind Pandemien, die durch das Auftreten oder Wiederauftreten eines neuen IVA-Subtyps, der davor mehrere Jahrzehnte nicht in der menschlichen Bevölkerung zirkulierte, oder – wie die Erfahrung aus 2009 gezeigt hat – durch eine antigenetisch stark unterschiedliche Variante eines bekannten Subtyps, in diesem Fall A/H1N1, hervorgerufen werden. Weil die Mehrheit der menschlichen Bevölkerung nicht immun gegen dieses Virus ist, kann sich das Virus in einer weltumfassenden Epidemie über den Globus verbreiten. Die größte Pandemie des letzten Jahrhunderts, die „Spanische Grippe“ 1918-19, verursachte ca. 40 Millionen Tote [Robert Koch-Institut. 2011].

### 2.2.2 Übertragung

Influenzaviren werden überwiegend aerogen durch Tröpfcheninfektion übertragen. Dies geschieht durch Expirationströpfchen, die beim Niesen, Husten, Sprechen oder Atmen entstehen. Dabei sinken größere Tröpfchen mit einer Partikelgröße  $>5\ \mu\text{m}$  schnell nach unten, d.h. sie können nur Personen in unmittelbarer Nähe infizieren, und verkleben vor allem mit rauen Oberflächen. Sind die Expirationströpfchen mit  $<5\ \mu\text{m}$  sehr klein oder trocknen bereits in der Luft, so können die darin enthaltenen Viren als Aerosol über weite Strecken in der Luft schweben und mehrere Stunden infektiös bleiben [Robert Koch-Institut. 2011, Tellier. 2006]. Trockene Raumluft wirkt dabei begünstigend auf die Aerosolbildung [Schaffer et al. 1976]. Außerdem ist eine Übertragung durch direkten Kontakt der Hände zu mit virushaltigen Sekreten kontaminierten Oberflächen und anschließendem Hand-Mund-/Hand-Nasen-Kontakt möglich wie z.B. durch Händeschütteln. Weitere Übertragungsmöglichkeiten stellen der Kontakt mit kontaminierten Exkrementen oder Wasser dar, die vor allem bei der aviären Influenza gelten [Robert Koch-Institut. 2011]. Influenzaviren sind unempfindlich gegen Austrocknung und können bei niedriger Temperatur und Luftfeuchtigkeit über mehrere Wochen infektiös bleiben. Die Inkubationszeit beträgt je nach Virus-Subtyp bis zu 4 Tage [Longini et al. 2005], und die Ausscheidung vermehrungsfähiger Viren, also die Dauer der Infektiosität, wird im Mittel mit etwa 4-5 Tagen ab Auftreten der ersten Symptome angegeben. Längere Zeiträume von 7-14 Tagen sind möglich und vor allem bei Kindern mit Erstinfektion sowie hospitalisierten Patienten mit chronischen Vorerkrankungen und schweren Verläufen zu beobachten. Als Eintrittspforte des Virus beim Menschen gelten die Schleimhäute des Respirationstraktes, des Mundes und der Konjunktiven. Die Virusvermehrung erreicht in den Epithelien des Atemtraktes einen Gipfel zwei bis drei Tage post infectionem [Robert Koch-Institut. 2011, Klenk. 2010].

### 2.2.3 Klinik

Plötzlicher Krankheitsbeginn mit Fieber von  $\geq 38,5^\circ\text{C}$ , trockener Reizhusten, Halsschmerzen, starke Myalgien und/oder Kopfschmerzen kennzeichnen die Influenza-typische Symptomatik („influenza-like illness“), die von einem banalen „Grippalen Infekt“ anderer viraler Genese abgegrenzt werden muss. Dies ist klinisch manchmal mit Schwierigkeiten verbunden [Robert Koch-Institut. 2011]. Allgemeines Schwächegefühl und Inappetenz sind weitere Symptome, die oftmals über die

eigentliche Krankheitsdauer von 5-7 Tagen hinaus über mehrere Wochen bestehen bleiben können. Weiterhin kann sich die Influenza in Form von Rhinorrhoe, Krupp-Husten bei Kindern, Augentränen, Schüttelfrost bzw. Schweißausbrüche im Fieberanstieg bzw. bei Entfieberung, aber auch mit Übelkeit/Erbrechen und Diarrhoe klinisch manifestieren [Centers for Disease Control. 2005]. Die Infektion kann jedoch auch asymptomatisch bzw. deutlich milder verlaufen. Als Faustregel gilt ungefähr: Influenzainfektionen verlaufen zu jeweils einem Drittel entweder fieberhaft, mild oder latent. Die Krankheitsdauer kann sich in Abhängigkeit von Komplikationen und Risikofaktoren verlängern [Robert Koch-Institut. 2011]. Bei den schweren Verlaufsformen stehen vor allem die pulmonalen Komplikationen im Vordergrund: primäre Influenzapneumonie, bakterielle Pneumonie nach Superinfektion mit Pneumokokken, Haemophilus influenzae und Staphylokokken sowie Exazerbationen chronischer Lungenerkrankungen. Eine systemische Infektion kann zum Befall weiterer Organsysteme führen und sich als Myositis und Rhabdomyolyse, Enzephalitis oder Myokarditis manifestieren, wobei Komplikationen des Zentralen Nervensystems meist bei Kindern beobachtet werden. Anhaltendes Fieber mehr als drei Tage, Dyspnoe, Tachypnoe, Orthopnoe, Lippenzyanose, blutig-tingiertes Sputum, Brustschmerz, Hypotonie, Schläfrigkeit, Verwirrtheit, Dehydratation und ausgeprägte allgemeine Schwäche können Zeichen einer schnell fortschreitenden Influenza-Erkrankung sein, die oft etwa 3-5 Tage nach Symptombeginn bei schwerem Krankheitsverlauf auftreten [Robert Koch-Institut. 2011, Klenk. 2010]. Risikogruppen dafür sind ältere Personen über 60 Jahre und Patienten mit chronischen Grunderkrankungen wie chronische Herzerkrankungen, chronische Lungenerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus), Immundefekte, neurologische bzw. neuromuskuläre Erkrankungen (bei Influenza A/H1N1/pdm09), schwere Adipositas sowie Schwangerschaft, v.a. im fortgeschrittenem Stadium [Robert-Koch-Institut. 2011, Klenk. 2010]. Auch Kinder und Jugendliche sind aufgrund ihres nicht vollständig ausgereiften Immunsystems und der im frühen Kindesalter noch naiven humoralen Immunität prädisponiert für schwere Verläufe wie Atemnotsyndrom bis hin zur Beatmungspflichtigkeit, Myokarditiden oder Enzephalopathien. Eine weitere häufige Komplikation stellt die Otitis media dar [Peltola et al. 2002]. Außerdem ist bei Kindern zu beachten, dass die Gabe von Salizylaten kontraindiziert ist, da diese zum Reye-Syndrom mit akuter Enzephalopathie in Kombination mit fettiger Degeneration der Leber führen kann. Schwerste

Verlaufsformen der Influenza können mitunter perakut innerhalb weniger Stunden zum Tode führen [Klenk. 2010, Robert Koch-Institut. 2011].

#### **2.2.4 Diagnostik**

Bei Epidemien und während der Hochphasen der Influenzasaison in den Wintermonaten kann die Diagnose klinisch erfolgen. Hier hat die „Influenza-like-illness“-Symptomatik einen guten Vorhersagewert, sodass die Infektion bei den meisten Patienten mit hinreichender Wahrscheinlichkeit anhand der klinischen Präsentation diagnostiziert werden kann. Da jedoch andere Erreger wie z.B. Respiratory Syncytial Virus (RSV), Humanes Metapneumovirus (hMPV) oder Mykoplasmen sehr ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen können, ist bei sporadisch, außerhalb von Influenzawellen auftretenden Erkrankungen die Diagnose einer Influenza basierend auf der klinischen Symptomatik nicht sicher möglich [Robert Koch-Institut. 2011]. Vor allem bei Risikogruppen und bei Andeutung eines schweren Verlaufs kann eine schnelle Influenzadiagnostik von Bedeutung sein, da bei positivem Ergebnis eine schnelle Medikation innerhalb von 48 Stunden erfolgen muss, um wirksam zu sein [WHO. 2005a].

#### Probenmaterial

Proben aus den Atemwegen stehen hier an erster Stelle. Wichtig bei der Probenentnahme ist der Zeitpunkt, da man die besten Resultate erzielt, wenn die Gewinnung innerhalb der ersten vier Tage nach Auftreten der Symptomatik erfolgt. Abstriche aus der hinteren Nasenhöhle, der klassische tiefe Rachenabstrich, nasale und nasopharyngeale Spülungen sowie Trachealsekret oder die Bronchoalveoläre Lavage (BAL), vor allem bei intubierten Patienten, sind häufig genutzte Methoden, wobei die Spülungen sensitiver als Abstriche sind [WHO. 2005a, Kamps et al. 2006]. Blutproben werden für die Antikörperserologie gewonnen.

#### Labortests

Hier unterscheidet man zwischen direkten Methoden, Methoden der Virusisolierung und der Serologie.

#### Direkte Methoden:

- a) Immunfluoreszenz: Potenziell infizierte Epithelzellen aus den Atemwegen werden auf einem Objektträger fixiert und die in den Zellen enthaltenen viralen Antigene durch spezifische Antikörper erkannt. Diese Antikörper sind entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden (direkte Immunfluoreszenz) oder werden von sekundären Antikörpern detektiert, an denen ein fluoreszierender Stoff gebunden ist (indirekte Immunfluoreszenz). Die Reaktion wird fluoreszenz-mikroskopisch sichtbar gemacht. Diese Methode ermöglicht eine rasche Diagnosestellung unter der Voraussetzung, dass ausreichend Atemwegsepithel in den Proben vorhanden ist. Die Ergebnisse sind aufgrund der individuellen Auswertung stark untersucherabhängig und erfordern ein hohes Maß an Erfahrung [Kamps et al. 2006].
- b) Enzymimmunoassay (EIA): Diese können sowohl virale Antigene (direkter EIA) als auch Antikörper gegen virale Antigene (indirekter EIA, verwendet für Serologie) nachweisen. Definition und Testprinzip siehe Abschnitt 4.2.1. Verschiedene Schnelltests können entweder das IVA oder IVB ohne Unterscheidung der Subtypen nachweisen, oder sie können nur das IVA nachweisen, oder sie weisen sowohl IVA und IVB als auch den Subtyp nach [US Food and Drug Administration. 2005].
- c) Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR): Diese ist eine Reaktion, bei der zunächst die RNA in komplementäre DNA umgewandelt wird, und ein Abschnitt des Genoms dann mit Hilfe von Primern, die spezifisch an dieser Zielregion binden, amplifiziert wird. Durch die Reaktion eines thermostabilen DNA-Polymerase-Enzyms, das ein hochsensibles Auffinden von kleinsten Mengen eines viralen Genoms ermöglicht, wird eine exponentielle Vervielfältigung von winzigen Mengen an Nukleinsäure ermöglicht [Kamps et al. 2006]. Die RT-PCR besitzt eine hohe Sensitivität [Steininger et al. 2002] und kann auch zur Differenzierung zwischen Subtypen und zur Durchführung phylogenetischer Analysen herangezogen werden [Allwinn et al. 2002].

#### Virusisolierung:

- a) Embryonale Eizellkultur: Es erfolgt die Beimpfung der Amnionhöhle von 10-12 Tage alter embryonaler Hühnereier mit Probenmaterial. Nach dreitägiger Inkubationszeit können große Mengen an Virus gewonnen werden [WHO. 2005b].

Für die Routinediagnostik wird diese Methode nicht mehr angewendet. Referenzlabore nutzen dennoch dieses Kultursystem, um eine hohe Sensitivität des Virusnachweises zu gewährleisten und um Viren produzieren zu können, die für epidemiologische Untersuchungen vorrätig gehalten werden [Kamps et al. 2006].

- b) Zellkultur: Konventionell oder „Shell vial culture“. Primäre Nierenzellen vom Affen und Madin-Darby Hundenierenzellen (MDCK) werden als Zelllinien bei der konventionellen Kultur benutzt, um Influenzaviren zu isolieren. Die Methode besitzt eine hohe Sensitivität und dauert etwa zwei Wochen. Zytopathogene Effekte wie Synzytienbildung und Bildung von basophilen Einschlusskörperchen können nach Infektion der Zellen beobachtet werden. Zum Nachweis von Influenzaviren wird die HämadSORption mittels Erythrozyten von Meerschweinchen oder die Immunfluoreszenz verwendet, wobei letztere eine höhere Sensitivität besitzt und auch zur Virustypisierung dient [Weinberg et al. 2005, Kamps et al. 2006]. Mit Hilfe der „Shell vial culture“ ist eine Diagnosestellung innerhalb von 48 Stunden möglich [Allwinn et al. 2002]. Erreicht wird dies durch Zentrifugieren des Inokulats auf eine einschichtige Zellkultur und anschließender Immunfluoreszenz, bevor ein zellschädigender Effekt beobachtet werden kann. Diese Methode ist jedoch weniger sensitiv als eine konventionelle Kultur [Weinberg et al. 2005].

#### Serologie:

Es erfolgt der Nachweis influenzaspezifischer Antikörper (gesamt, IgG, IgM, IgA) im Serum oder Körperflüssigkeiten. Die serologische Diagnostik besitzt bei der Diagnosestellung einer akuten Infektion nur einen geringen Stellenwert. Wenn sie jedoch genutzt wird, so muss ein mindestens vierfacher Titeranstieg nachzuweisen sein, wofür sowohl eine Probe aus der akuten als auch aus der Genesungsphase benötigt wird [Klenk. 2010]. Die Serologie wird vor allem aber bei epidemiologischen Untersuchungen und zur Beurteilung des Ansprechens einer Impfung eingesetzt [Prince und Leber. 2003].

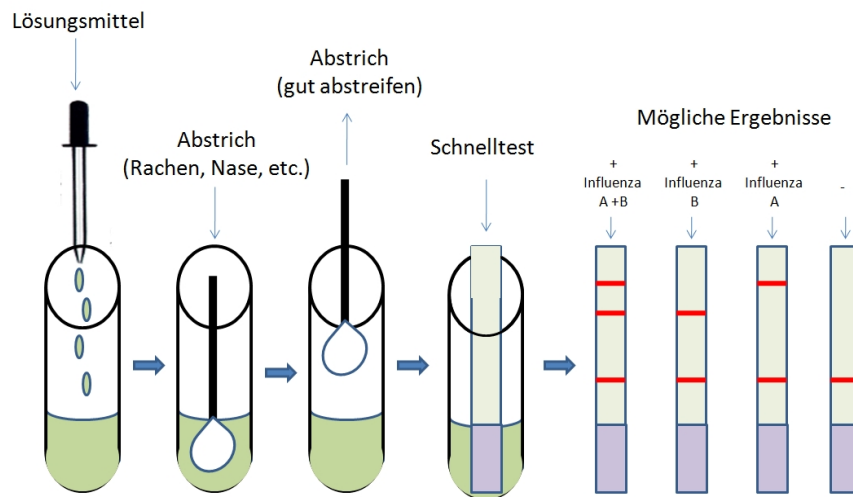
- a) Hämagglutinationshemmtest (HAHT): Dieser Test beruht darauf, dass die blutverklumpende bzw. hämagglutinierende Wirkung des HA der Influenzaviren durch neutralisierende Antikörper, die an die hämagglutinierenden Virusbestandteile binden, gehemmt wird. Der HAHT-Titer ist der Kehrwert der höchsten Serumverdünnung, bei der die Hämagglutination noch verhindert wird

[Feldkamp et al. 2004]. Der HAHT ist sensitiver als die Komplementbindungsreaktion [Julkunen et al. 1985, Prince und Leber. 2003] und bietet den zusätzlichen Vorteil, dass sie bei der Differenzierung der HA-Subtypen spezifischer ist [Julkunen et al. 1985].

- b) Komplementbindungsreaktion (KBR): Antigen-Antikörper-Komplexe binden Komplement. Dieser Komplementverbrauch kann mittels eines standardisierten hämolytischen Testsystems, d.h. Anti-Erythrozyten-Antikörper-beladene Erythrozyten, nachgewiesen und durch Vergleich mit Kontrollseren quantitativ bestimmt werden. Dabei wird dem Proben Serum das virale Antigen beigelegt. Bei Vorhandensein spezifischer Antikörper bilden sich Immunkomplexe, die Komplement verbrauchen. Die dann zugeführten Testerythrozyten werden nicht hämolysiert und die KBR ist positiv [Feldkamp et al. 2004]. Das Verfahren wird aktuell jedoch nur noch selten genutzt.
- c) Enzymimmunoassay (EIA): Diese sind sensitiver als HAHT- oder KBR-Assays [Bishai und Galli. 1978, Julkunen et al. 1985]. Es stehen verschiedene kommerzielle EIA zur Verfügung. Assays, die IgG und IgA detektieren, sind sensitiver als IgM-Assays, aber sie können keine akute Infektion nachweisen [Julkunen et al. 1985]. Der EIA kann Influenza-spezifische Antikörper typenspezifisch ohne Unterscheidung der Subtypen nachweisen [Sauerbrei et al. 2009].

#### Schnelltest:

Der Influenza-Schnelltest dient der schnellen, orientierenden Diagnose der Influenza und beruht auf dem Nachweis von Influenza-Antigenen im Probenmaterial wie Nasenspülflüssigkeit oder Nasen-/Rachenabstrich nach dem Prinzip des EIAs. Der Schnelltest ermöglicht eine Diagnosestellung innerhalb von 10-30 min und dient vor allem der Abgrenzung zu anderen akuten respiratorischen Infektionen und zur schnellen Diagnosesicherung. Dies ist für den Einsatz von Neuraminidasehemmern wichtig, da der Therapiebeginn innerhalb 48 Stunden nach Infektion erfolgen muss. Die Anwendung des Tests ist vor allem bei Patienten mit Risikofaktoren sinnvoll, bei denen eine spezifische Therapie deren Outcome verbessern kann [Kamps et al. 2006, Robert-Koch Institut. 2011]. Die Antigen-Assays sind jedoch weniger sensitiv als die RT-PCR, die Virusisolierung oder die direkte Immunfluoreszenz [Kamps et al. 2006]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung eines Influenza-Schnelltests.



Schema eines Influenza-Schnelltestes

Abb. 3: Darstellung der Durchführung eines Influenza-Schnelltestes. Link: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c2/Influenza-Schnelltest.png>.

Tabelle 1 vergleicht die Eigenschaften der verschiedenen Testmethoden, die für die Influenzadiagnostik zur Verfügung stehen.

Tab. 1: Vergleich der Testcharakteristika verschiedener Methoden zur Labordiagnostik der Influenza\* [Kamps et al. 2006]

Test	Sensitivität	Dauer bis zum Ergebnis	Aufwand	Kosten
<b>Direkter Nachweis</b>				
Schnelltest (EIA/ Chromatografie)	- 2	+ 2	+ 2	0
Immunfluoreszenz	0	+ 1	+ 1	+ 1
Gelelektrophorese RT-PCR	+ 2	0	- 1	- 2
Real time RT-PCR	+ 2	+ 1	- 1	- 2
<b>Viruskultur</b>				
Routine-Kultur	+ 2	- 2	- 1	+ 2
Shell vial culture	+ 1	0	- 1	+ 1
<b>Serologie</b>				
EIA	+ 2	- 2	+ 1	+ 2
HAHT	+ 1	- 2	- 1	+ 2
KBR	0	- 2	- 2	+ 2

\* Relative Kriterien für die Favorisierung von Tests (5 Punkte Skala)

-2: sehr ungünstige Eigenschaft

-1: ungünstige Eigenschaft

0: durchschnittliche Eigenschaft

+1: günstige Eigenschaft

+2: sehr günstige Eigenschaft.



### 2.2.5 Therapie und Prophylaxe

Die Therapie-Säulen für die Behandlung von Influenzavirus-Infektionen sind die symptomatische Therapie, die antivirale Therapie und die Therapie von Komplikationen wie beispielsweise sekundäre bakterielle Superinfektionen.

Bei unkompliziertem Verlauf ist Bettruhe und ausreichende Flüssigkeitszufuhr für die meisten Jugendlichen und jungen Erwachsenen die Therapie der Wahl. Bei Kopfschmerz, Fieber und Myalgie kann die Einnahme von Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) eine schnelle Besserung erzielen. Salicylate sind wegen des Zusammenhangs mit dem Auftreten des Reye-Syndroms bei Patienten jünger als 18 Jahre kontraindiziert [Kamps et al. 2006]. Bei Obstruktion der Nase werden abschwellende Nasensprays oder -tropfen, bei Husten Inhalationen mit Wasserdampf und, wenn nötig, Hustenstiller eingesetzt. Nach Abklingen des Fiebers sollte schnell wieder eine Normalisierung hin zur normalen körperlichen Aktivität erfolgen.

Bei schwerer verlaufenden Fällen gehört zur begleitenden Therapie eine Flüssigkeits- und Elektrolytkontrolle und schließlich die Gabe von Sauerstoff, Intubation und unterstützende Beatmung. Da zahlreiche Influenza-bedingte Schädigungen der Lunge und nachfolgende Todesfälle auf eine Überreaktion des Immunsystems („Zytokinsturm“) zurückgeführt werden, arbeiten Forscher seit einigen Jahren daran, Substanzen zu entwickeln, die im Falle einer Influenza-Erkrankung die Immunreaktion regulieren [Butler. 2007]. Eine antibiotische Behandlung sollte nur bei Verdacht auf bakterielle Superinfektion erfolgen mit einer anfangs kalkulierten Therapie unter Abdeckung der Problemkeime *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae* [Klenk. 2010]. Davor sollte immer auch eine mikrobiologische Diagnostik aus Probenmaterial durchgeführt werden, um nach Antibiotogramm gegebenenfalls auf eine gezielte erregerspezifische Therapie umzustellen.

Bei Verdacht auf einen schweren Verlauf einer Influenza-Erkrankung oder wenn ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf besteht, z.B. wenn eine oder insbesondere mehrere der in Abschnitt 2.2.3. genannten Vorerkrankungen oder eine Schwangerschaft vorliegen, sollte eine antivirale Therapie erwogen werden. Eine labordiagnostische Sicherung der Diagnose ist bei schwerer Symptomatik sinnvoll, sollte aber den Beginn der Therapie nicht verzögern [Robert Koch-Institut. 2011]. Eine antivirale Therapie sollte so früh wie möglich, innerhalb von 48 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome, begonnen werden. Bei schweren Verläufen kann der Einsatz

auch danach noch in höherer Dosierung und über einen längeren Zeitraum versucht werden und kann die Prognose positiv beeinflussen [Robert Koch-Institut. 2011]. Aktuell werden therapeutisch fast ausschließlich die Neuraminidasehemmer Oseltamivir und Zanamivir angewendet. Sie blockieren die Aktivität der viralen NA und damit die Freisetzung neugebildeter Viren. Eine Wirksamkeit besteht sowohl gegen IVA als auch IVB. Resistenzbildungen sind bisher selten aufgetreten. Sie sind abhängig vom viralen Subtyp und treten dann im Allgemeinen nur im Rahmen einer unterdosierten oder länger verabreichten Therapie auf [Robert Koch-Institut. 2011]. Eine Ausnahme stellen die saisonalen A/H1N1-Viren dar, die in den zwei Jahren vor der Pandemie 2009 zirkulierten, also ab 2007/08. Oseltamivir-resistente A/H1N1-Viren mit einer erworbenen Resistenz durch Mutation H275Y im NA-Gen setzten sich vollständig gegen die sensitive Variante durch, blieben aber sensitiv gegen Zanamivir. Das pandemische Virus A/H1N1 2009, die saisonalen A/H3N2- und die B-Viren sind dagegen weiterhin, mit Ausnahme von Einzelfällen, sowohl gegen Oseltamivir als auch gegen Zanamivir sensitiv [Robert Koch-Institut. 2011]. Übelkeit/Erbrechen beim oral einzunehmenden Oseltamivir sowie die Induktion von asthmatischen Anfällen bei Asthmatikern beim inhalativ applizierten Zanamivir können als Nebenwirkungen auftreten. Neuraminidasehemmer vermindern den Schweregrad und die Dauer der Erkrankung. Zudem gibt es Hinweise, dass sie bei rechtzeitiger Einnahme auch vor Hospitalisierung und tödlichem Verlauf schützen können [Robert Koch-Institut. 2011]. Oseltamivir ist für akute Influenza-Infektionen bei Patienten ab einem Jahr, Zanamivir und Amantadin ab 5 Jahren zugelassen. Die Therapiedauer der Neuraminidasehemmer beträgt in der Regel 5 Tage [Kamps et al. 2006].

Amantadin und Rimantadin aus der Klasse der MP 2-Membranproteinhemmer werden in der Praxis quasi nicht mehr bei akuten Influenza-Infektionen verwendet. Rimantadin ist in Deutschland zudem nicht zugelassen. Sie hemmen das virale MP und damit das Eindringen des Virus in den Zellkern. Nachteilig ist zudem, dass sie nur gegen IVA wirksam sind, bei therapeutischer Anwendung sehr rasch zur Bildung resistenter Viren führen und relativ häufig neurologische Nebenwirkungen wie z.B. Schlaflosigkeit und Nervosität hervorrufen. Sowohl beim saisonalen A/H3N2-Virus als auch beim pandemischen A/H1N1pdm09-Virus besteht eine nahezu vollständige Resistenz gegen Amantadin [Robert Koch-Institut. 2011]. Angaben zur Dosierung und weitergehende Informationen finden sich in den Empfehlungen der Fachgesellschaften und in den Fachinformationen der Hersteller.

### Präventionsmaßnahmen

Die Gripeschutzimpfung stellt die wichtigste und bedeutendste Maßnahme der Prävention dar (siehe Abschnitt 2.3.). Auch eine Impfung gegen Pneumokokken wird empfohlen, da diese vor der Komplikation einer bakteriellen Superinfektion mit *Streptococcus pneumoniae* bei Influenzavirus-Infektion schützen kann. Des Weiteren stellt die Einhaltung strikter Hygienemaßnahmen während einer Grippeperiode im Allgemeinen und besonders bei einem Krankheitsfall in unmittelbarer Umgebung wie beispielsweise in der Familie eine wirksame Infektionsprophylaxe dar. Das Tragen eines Mundschutzes, das Waschen und Desinfizieren der Hände und das Vermeiden engen Kontaktes zu bereits infizierten Patienten sind hierbei wichtige Maßnahmen. Sie dienen der Verminderung der Verbreitung der Viren. Auch die zur Verfügung stehenden antiviralen Arzneimittel wie Oseltamivir, Zanamivir und Amantadin sind für die Prävention von Influenza-Erkrankungen geeignet. Man unterscheidet den präexpositionellen Einsatz, wie z.B. bei Personen, die aufgrund einer Immunschwäche oder einer anderen Vorerkrankung nicht geimpft werden können oder nur einen unzureichenden Impfschutz ausbilden, und den postexpositionellen Einsatz, wie z.B. bei Personen mit Immunschwäche mit engem Kontakt zu einem Influenza-Infizierten in der Familie [Robert Koch-Institut. 2011]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei Personen mit Vitamin-D-Mangel die Anfälligkeit für Influenza signifikant gesenkt werden konnte, wenn deren 25(OH)D-Spiegel durch tägliche Gaben von 2000 I.E. Vitamin D angehoben wurde [Canell et al. 2008, Urashima et al. 2010, Ginde et al. 2009]. Vitamin D spielt eine wesentliche Rolle bei der angeborenen Immunität. Seine aktive Form, das Calcitriol, greift auf verschiedene Weise in das Immunsystem ein und fördert unter anderem die Bildung antimikrobieller Peptide wie z.B. Cathelicidin [Adams und Hewison. 2008]. Ein Mangel kann durch die dunklere Jahreszeit, also den Wintermonaten, in der auch die Zeit der saisonalen Grippeperiode fällt, bedingt sein. Eine Kontrolle des Vitamin-D-Spiegels wäre deshalb ebenso zu empfehlen wie die Substitution bei einem daraus diagnostizierten Mangel mit Werten unter 30 ng/dl.

### Meldepflicht

Dem Gesundheitsamt wird gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 24 IfSG nur der direkte Nachweis von Influenzaviren namentlich gemeldet. Dazu gehören auch in ärztlichen Praxen durchgeführte Schnelltests. Darüber hinaus stellt das Gesundheitsamt gemäß § 25 Abs. 1 IfSG ggf. eigene Ermittlungen an. Die Verordnung über die Meldepflicht bei

Influenza, die durch das erstmals im April 2009 in Nordamerika aufgetretene neue Virus der „Schweine-Grippe“ hervorgerufen wird, vom 30. April 2009, geändert am 14. November 2009, ist am 1. Mai 2010 außer Kraft getreten [Robert Koch-Institut. 2011].

## **2.3 Influenzaschutzimpfung**

### **2.3.1 Allgemeines**

Die Schutzimpfung stellt die kosteneffektivste Präventionsmaßnahme dar und sollte jährlich, vorzugsweise im Oktober und November vor der saisonalen Grippewelle durchgeführt werden. Die volle Ausbildung eines Impfschutzes dauert etwa 2 Wochen. Bei guter Übereinstimmung der Impfstämme mit den zirkulierenden Stämmen besteht ein bis zu 90%iger Schutz für gesunde Menschen unter 60 Jahren. Bei Älteren ist die Schutzrate aufgrund der natürlichen Alterung des Immunsystems deutlich geringer [Klenk. 2010]. Gerade in dieser Altersgruppe ist die Impfung aber besonders wichtig, da sie wesentlich zur Reduktion von Komplikationen, Hospitalisierungen und Todesfällen durch Influenza beitragen kann [Robert-Koch-Institut. 2011].

### **2.3.2 Aktuelle Impfempfehlungen für Deutschland**

In Deutschland wird die jährliche Influenzaschutzimpfung im Herbst unter Verwendung eines Impfstoffs mit aktueller, von der WHO empfohlener Antigenkombination für folgende Personengruppen laut der Ständigen Impfkommission des Robert Koch-Instituts (STIKO) empfohlen [Robert Koch-Institut. 2013]:

- alle Schwangeren ab 2.Trimenon, bei erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens ab 1.Trimenon
- Kinder, Jugendliche und Erwachsene mit erhöhter gesundheitlicher Gefährdung infolge eines Grundleidens, wie z. B. chronische Krankheiten der Atmungsorgane (inklusive Asthma und COPD), chronische Herz-Kreislauf-, Leber- und Nierenkrankheiten, Diabetes und andere Stoffwechselkrankheiten, chronische neurologische Krankheiten (z.B. Multiple Sklerose mit durch Infektionen getriggerten Schüben), Personen mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten mit T- und/oder B-zellulärer Restfunktion, HIV-Infektion
- Bewohner von Alters- oder Pflegeheimen
- Personen mit erhöhter Gefährdung wie z. B. medizinisches Personal, Personen in Einrichtungen mit umfangreichem Publikumsverkehr sowie Personen, die als

mögliche Infektionsquelle für von ihnen betreute Risikopersonen fungieren können, Personen mit erhöhter Gefährdung durch direkten Kontakt zu Geflügel und Wildvögeln.

Bei Letzterem bietet die Impfung zwar keinen direkten Schutz vor der aviären Influenza, aber kann Doppelinfektionen mit saisonalen Varianten verhindern.

Kinder und Jugendliche im Alter von 2 bis einschließlich 17 Jahren können mit inaktiviertem Impfstoff oder mit einem attenuierten Influenza-Lebendimpfstoff (LAIV) geimpft werden, sofern keine Kontraindikation besteht (siehe Fachinformation). Bei Kindern im Alter von 2 bis einschließlich 6 Jahren sollte LAIV bevorzugt angewendet werden [Robert Koch-Institut. 2013].

### 2.3.3 Impfstoffklassen

Aktuell auf dem Markt befinden sich sowohl Lebend-attenuierte als auch Tot-Impfstoffe. Bei den Tot-Impfstoffen kann man wiederum unterscheiden in Vollvirusimpfstoffe (inaktivierte Ganzpartikelimpfstoffe), Spaltimpfstoffe (inaktivierte Teilpartikelimpfstoffe) und Subunit-Impfstoffe (Untereinheitsimpfstoffe: enthalten die gereinigten Oberflächenantigene HA und NA). Letztere können auch als virosomale Impfstoffe (Oberflächenantigen sind in Lipidmembran eingebettet) oder als Adjuvanz-Impfstoffe vorliegen. Subunit-Impfstoffe sind nur wenig immunogen, haben aber dafür nur geringe Nebenwirkungen. Durch den Zusatz von Adjuvanzen wird die Immunogenität erhöht auf Kosten eines ungünstigeren Nebenwirkungsprofils.

Die Impfstoffkombination wird von der WHO jährlich an die häufigsten kursierenden Typen angepasst (Link: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/en/>). Zur saisonalen Grippe gehören meist die drei Typen A/H3N2, A/H1N1 und B. Für Deutschland werden die Impfstoffe durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassen (Link: <http://www.pei.de/DE/arzneimittel/impfstoff-impfstoffe-fuer-den-menschen/influenza-grippe/influenza-grippe-node.html>). Während der Saison 2012/2013 und in den Jahren davor wurden trivalente Impfstoffe eingesetzt. Für die Grippesaison 2012/13 wurde erstmals auch ein nasal applizierbarer Lebendimpfstoff, unter dem Namen Fluenz für Kinder zwischen 2 und 18 Jahren von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen [Europäische Arzneimittel-Agentur. 2012], empfohlen. In Studien zeigte sich nicht nur eine gute Wirksamkeit im Vergleich mit einem Placebo, sondern der Schutz ist auch vergleichbaren Totimpfstoffen überlegen [Zepp. 2012]. Die Zusammensetzung entspricht den aktuellen Empfehlungen der WHO.

### 2.3.4 Influenza-Infektionen und Schutzimpfung bei Kindern und Jugendlichen

Erstinfektionen der Influenza zeigen oft einen schweren Verlauf. Dies ist besonders dann der Fall, wenn neue Influenzaviren auf eine vorwiegend immunologisch naive Population, insbesondere im Kindesalter, trifft [Heikkinen et al. 2004]. Zudem scheiden Kinder mit Erstinfektion die Viren wesentlich länger und in höherer Konzentration aus als alle anderen Altersgruppen und sind somit maßgeblich an der Ausbreitung in der Gesamtbevölkerung beteiligt [Zepp. 2012]. Mehrere Studien weisen höhere Influenzavirus-Konzentrationen im Nasenrachen und längere Virusausscheidungen bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen nach [Frank et al. 1981, Hall et al. 1979]. Kleinkinder sind deshalb eine der am meisten gefährdeten Gruppen, da die plazentar von der Mutter übertragenen Antikörper nach etwa einem Jahr abgebaut sind und die Kinder dann immunologisch naiv gegenüber Influenzaviren sind [Sauerbrei et al. 2009]. Daraus folgt, dass die Krankheitslast der Influenza bei Kleinkindern im Vergleich zu älteren Kindern und Jugendlichen höher ist [Heikkinen et al. 2004]. Kommt dann noch eine chronische Grunderkrankung wie z.B. chronische Atemwegserkrankungen oder Immundefekte hinzu, erhöht sich das Risiko für schwere Influenza-Infektionen, und die Influenza-assoziierte Mortalität steigt [Neuzil et al. 2000a, Streng et al. 2011, Wieching et al. 2012].

Die Infektion bei Kindern erfolgt bevorzugt über den Respirationstrakt [Mossong et al. 2008], und die Immunität nach Erstinfektion ist geringer ausgeprägt als bei Erwachsenen, weshalb zahlreiche subklinische Reinfektionen für die Etablierung einer natürlichen Immunität erforderlich sind [Corbel. 2007]. Häufige Komplikationen bei schweren Verläufen einer Influenza-Infektion im Kindesalter sind Pneumonie (primäre Influenzapneumonie oder durch bakterielle Superinfektion), Tracheobronchitis, Krupp, Otitis media, Sinusitis, Fieberkrämpfe, Myokarditis und Enzephalitis [Heikkinen et al. 2004], die zu hohen Hospitalisierungsraten in dieser Altersgruppe führen [Izurieta et al. 2000, Weigl et al. 2002, Hite et al. 2007] und beträchtliche sozioökonomische Auswirkungen auf deren Haushalte haben [Principi et al. 2004]. Die Influenza A ist im Gegensatz zur Influenza B mit einer deutlich höheren Morbidität assoziiert [Robert Koch-Institut. 2000]. Einige Studien zeigen jedoch, dass auch die Influenza B mit einer nicht zu unterschätzenden Morbidität und Letalität bei Kindern einhergeht [Troendle et al. 1992, van den Dungen et al. 2001, Munoz. 2003]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Influenza eine bedeutende Ursache von Morbidität in der Kindheit ist und Infektionsraten von bis zu 20-30%, während Epidemien noch wesentlich mehr,

erreichen kann [Heikkinen et al. 2004]. Deshalb wird die Altersgruppe der Kinder und Jugendlichen als Hauptüberträger der Influenza angesehen [Monto und Sullivan 1993, Glezen et al. 1997, Hurwitz et al. 2000].

Die wirksamste Intervention, um die hohe Morbidität und Mortalität der Kinder aufgrund Influenzavirus-Infektionen zu verhindern, ist die jährliche Impfung gegen die saisonale Grippe [DiazGranados et al. 2012]. Studien in Deutschland haben gezeigt, dass 50% der schweren Influenza-Fälle auf pädiatrischen Intensivstationen hätten verhindert werden können, wenn die aktuellen Empfehlungen für die Impfung von Risikogruppen beachtet worden wären [Streng et al. 2011]. Es muss jedoch auch festgehalten werden, dass aufgrund der ständigen saisonalen Änderungen von zirkulierenden Virusvarianten und -subtypen und aufgrund des erst in Entwicklung befindlichen kindlichen Immunsystems die saisonale Impfung gegen Influenza keinen vollständigen Schutz vor Infektionen bietet [Lee und Shah. 2012]. Dennoch würden immunologisch naive jüngere Kinder von der Impfung profitieren, da sie ein erhöhtes Risiko für schwere Influenza-Infektionen besitzen – viel mehr als ältere Kinder, die schon eine oder mehrere Influenza-Infektionen im Laufe ihres Lebens durchgemacht haben [Izurieta et al. 2000, Neuzil et al. 2000b, Weigl et al. 2002]. Trotz hoher Krankheitsbelastung wird die Influenza-Schutzimpfung für gesunde Kinder derzeit in Deutschland nicht empfohlen, sondern nur für Kinder, bei denen die Influenza eine erhöhte gesundheitliche Gefährdung infolge eines Grundleidens darstellt [Robert Koch-Institut. 2010]. Die USA und Kanada jedoch empfehlen seit einigen Jahren die universelle Influenza-Schutzimpfung für alle Kinder im Alter von 6 Monaten bis 18 Jahren bzw. 6 bis 23 Monaten aufgrund des erhöhten Risikos von Komplikationen und der erhöhten Hospitalisierungsrate [American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. 2002, American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. 2006, Smith et al. 2006]. Eine Europäische Expertengruppe publizierte 2006 eine ähnliche Empfehlung [Heikkinen et al. 2006]. Dennoch wird diese in nur wenigen europäischen Ländern umgesetzt. Die Begründung der zuständigen Institutionen ist die schlechte Wirksamkeit der nicht-attenuierten Totimpfstoffe bei Kindern und Jugendlichen. Dies könnte sich mit der seit 2012 von der EMA erstmals in Europa für Kinder von 2-17 Jahren zugelassenen attenuierten Lebendvakzine (Fluenz, intranasal applizierbar) ändern, die im August 2013 auch in die neuen Empfehlungen der STIKO aufgenommen wurde. Vergleichsstudien ergaben, dass bei Kindern von 6 Monaten bis 17 Jahren virologisch gesicherte Influenza-Infektionen bei Lebendvakzine-Impfungen

35-53% seltener auftraten als bei nicht geimpften Kindern und der Lebendimpfstoff den Totimpfstoffen hinsichtlich der Wirksamkeit überlegen ist [Zepp. 2012].

Nicht nur bei den Kindern, sondern auch bei den Senioren sollten die Impfstoffklassen so gewählt werden, dass eine maximale Wirksamkeit bei Beachtung der jeweiligen Charakteristika hinsichtlich des Immunsystems innerhalb der einzelnen Altersgruppen gewährleistet ist. So sollten für Kinder und Jugendliche der neue Lebendimpfstoff und für Senioren adjuvantierte Totimpfstoffe eingesetzt werden, da im Alter eine gewisse physiologische Alterung des Immunsystems mit vermindertem Ansprechen auf Impfungen einhergeht [Weinke. 2012].

### **2.3.5 Bestimmung der Seroprävalenz von Influenza A und B**

Als Seroprävalenz gilt die Häufigkeit des Vorkommens von erregerspezifischen IgG-Antikörpern im Blut. Sie spricht für eine bereits durchgemachte natürliche Infektion oder Impfung. Seroprävalenzstudien stellen eine grundlegende Voraussetzung für die Entwicklung von wirksamen Impfungen für diese Altersgruppen dar. Bedingungen für eine möglichst genaue Bestimmung der Seroprävalenz sind neben validen serologischen Tests mit hoher Sensitivität und Spezifität auch die Möglichkeit einer automatisierten Durchführung und die Auswahl eines repräsentativen Panels. Dass die saisonale Influenza durch IVA und IVB hervorgerufen wird, erschwert die Bestimmung ebenso wie die Tatsache, dass innerhalb der Viren noch zwischen Subtypen bei IVA bzw. Linien bei IVB unterschieden wird. Die Detektion der Subtypen- und Linien-spezifischen Immunantwort wird mittels HAHT (Goldstandard) oder Mikroneutralisationstest durchgeführt, gibt aber eben nicht die Gesamtprävalenz unabhängig von Subtyp bzw. Linie wieder. Der HAHT ist zudem aufgrund seines Aufwandes für große Prävalenzstudien ungeeignet [Sauerbrei. 2012]. Dafür ist der Einsatz subtypen- und linienübergreifender IgG-ELISAs erforderlich. Dass keine ausreichenden Erfahrungen und validierten ELISAs für solche großen Seroprävalenzstudien vorliegen, stellt jedoch ein Problem dar. Die Beseitigung dieser Probleme hat eine große Rolle im Rahmen der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gespielt, weshalb drei unterschiedliche IVA- und IVB-IgG-ELISAs zum Einsatz kamen.

Bislang gibt es nur wenige epidemiologische Studien zur Seroprävalenz von IVA und IVB bei Kindern und Jugendlichen weltweit und für Deutschland. Die bisherigen Studiendaten beschränken sich auf zu kleine Regionen oder die Tests waren



Virusstamm-spezifisch [Yeolekar et al. 2003, Sauerbrei et al. 2009, Bodewes et al. 2011]. Auch gibt es nur wenig Erfahrung mit der Verwendung von ELISAs als Methode zur Prävalenzbestimmung. Eine solche regional begrenzte Seroprävalenzstudie stammt aus dem hiesigen Arbeitskreis und arbeitete ebenfalls mit Typ-spezifischen IgG-ELISAs [Sauerbrei et al. 2009]. Dabei wurden IgG-Antikörper gegen Influenza A und B retrospektiv bei Kindern und Jugendlichen in Thüringen bestimmt. Zum Einsatz kamen IVA- und IVB-IgG-ELISAs, die ebenfalls in der aktuellen Studie verwendet wurden. Es stellte sich jedoch die Frage, ob die erzielten Ergebnisse repräsentativ sind. Auch ergaben die Ergebnisse der IVB-Seroprävalenzen deutliche Diskrepanzen zu einer Prävalenzstudie von Schmitt-Ott et al. [2007]. Während bis zu einem Alter von 9 Jahren nur 1-2% der Kinder IVB-Antikörper besaßen, so waren es bis zum 18. Lebensjahr ca. 25% [Sauerbrei et al. 2009]. Im Gegensatz dazu war die IVB-Seroprävalenz mit 37,1% bei 6-9jährigen und 66% bei 10-13jährigen Kindern in der Studie von Schmitt-Ott et al. [2007] viel höher.

### **3 Ziele der Arbeit**

Ziel der Arbeit war die Ermittlung der Prävalenz IVA- und IVB-spezifischer Antikörper bei Kindern und Jugendlichen in verschiedenen Altersgruppen von 0 bis 17 Jahren. Die Studiengruppe setzte sich aus 1.665 Serumroben zusammen, die in 8 Kinderkliniken Deutschlands und einem diagnostischem Zentrum zwischen Mai 2008 und Juli 2010 gesammelt wurden. Als Kontrollgruppe dienten 400 Blutspender aus Hannover und Münster im Alter von 18 bis 65 Jahren. Als serologische Methoden kamen kommerziell vertriebene ELISAs der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL für die vergleichende subtypenunabhängige Bestimmung der IgG-Antikörper von IVA und IVB zum Einsatz. Dabei sollte aufgezeigt werden, inwieweit sich die Assays zur Seroprävalenzbestimmung eignen und wie stark die einzelnen Tests miteinander korrelieren. Die Ermittlung der Seroprävalenz im Kindes- und Jugendalter in Abhängigkeit von der Herkunft der Kinder bzw. Jugendlichen wurde als weiteres Zielkriterium betrachtet. Auch Vergleiche von Antikörperprävalenz und Antikörperkonzentration zwischen den Alters- und Geschlechtsgruppen der Kinder und Jugendlichen (Studiengruppe) sowie zwischen Studien- und Kontrollgruppe sollten vorgenommen werden. Für 1.396 Probanden lagen auch Informationen zum Impfstatus gegen die saisonale und pandemische Influenza im Zeitraum von ca. einem Jahr vor Serumentnahme vor, sodass ein Vergleich der Seroprävalenzen der geimpften und der nicht-geimpften Probanden erfolgen sollte. Es war zu prüfen, inwieweit die eingesetzten ELISAs IVA- und IVB-spezifische Antikörper, hervorgerufen durch Impfung, erfassen.

Die Prävalenzbestimmungen gegenüber IVA und insbesondere IVB sollten in erster Linie dazu beitragen, den Zeitpunkt der Primärinfektion im Kindes- und Jugendalter zu ermitteln. Die Ergebnisse sollten zudem mit bereits durchgeführten Studien zur Seroprävalenz der Influenza verglichen werden. Dabei diene vor allem die Vorgängerstudie von Sauerbrei et al. [2009] als Ausgangs- und Vergleichspunkt. Es war geplant, in Abhängigkeit von den Ergebnissen Schlussfolgerungen für die Durchführung einer allgemeinen Influenzaschutzimpfung im Kindesalter abzuleiten.

## 4 Material und Methodik

### 4.1 Probanden und Untersuchungsmaterial

#### 4.1.1 Studiengruppe

In die serologischen Untersuchungen wurden 1.665 Serumproben von Kindern und Jugendlichen im Alter von 0-17 Jahren aufgenommen. Diese Seren stammten aus dem Panel, das für eine Studie über die pandemische Influenza A/H1N1 erfasst wurde [von Kries et al. 2011]. Auskunft über die Herkunft der Proben sowie den Rekrutierungszeitraum gibt Tab. 2. Angaben zur Verteilung der Proben hinsichtlich des Alters und dem Geschlecht der Studienprobanden sind in Tab. 3 aufgeführt. 278 Proben (16,7%) der Kinder und Jugendlichen stammten aus dem Zeitraum Mai 2008 bis April 2009. Sie wurden also vor der Influenza A/H1N1-Pandemie entnommen. 1.387 Serumproben (83,3%) der Kinder und Jugendlichen wurden in der Spätphase der Influenza A/H1N1-Pandemie von April bis August 2010 entnommen.

Die Blutproben wurden bei routinemäßigen Laboruntersuchungen von stationär und ambulant behandelten Patienten gewonnen. Die einbezogenen Kinder und ihre Eltern wurden über die Studie durch einen Informationsbogen informiert und um schriftliche Zustimmung gebeten. Die Einschlusskriterien beinhalteten, dass es sich um Kinder und Jugendliche handelte, bei denen klinisch und diagnostisch keine Infektionskrankheit vorlag. Kinder mit Erkrankungen, die die Ausbildung einer adäquaten Immunantwort behindern, wie z.B. Immundefekte oder chronische Erkrankungen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Folgeseren konnten nicht entnommen werden, da es sich bei dem Untersuchungsmaterial um Restproben von diagnostischen Einsendungen handelte [von Kries et al. 2011]. Die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Verwendung der Seren wurde im Oktober 2011 eingeholt – Bestätigung mit dem Schreiben „FSU 3142-05/11“.

Informationen zum Influenzavirus-Impfstatus standen zur Verfügung. Von den Daten der 1.665 Kinderseren enthielten insgesamt 1.396 (83,8%) Informationen zum saisonalen und pandemischen Influenza-Impfstatus. Alle Serumproben lagerten seit ihrer Gewinnung ohne Unterbrechung der Kühlkette bei -20°C.

Tab. 2: Herkunft der Proben und Zeitraum der Probenentnahme.

Herkunft	Klinik / Institut	N (Prozent)	Rekrutierungs- Zeitraum
Berlin	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Vivantes Klinikum im Friedrichshain	85 (5,1 %)	August 2010
Bremen	Professor-Hess-Kinderklinik, Klinikum-Bremen-Mitte	268 (16,1 %)	April - Juli 2010
Erfurt	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Helios-Klinikum	108 (6,5 %)	April - Juli 2010
Krefeld	Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Helios-Klinikum	111 (6,7 %)	Juli 2010
Mannheim	Universitätskinderklinik, Universität Heidelberg, Mannheim	225 (13,5 %)	April - Juli 2010
München	Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum Dritter Orden	84 (5,0 %)	Juli 2010
Ulm	Institut für Virologie (Routineeinsendungen), Universitätsklinikum Ulm	278 (16,7 %)	Mai 2008 - April 2009
Wuppertal	Zentrum für Kinder - und Jugendmedizin, Helios-Klinikum	366 (22,0 %)	April - Juni 2010
Würzburg	Universitätskinderklinik, Universitätsklinikum Würzburg	140 (8,4 %)	April - Juli 2010
<b>Gesamt</b>		<b>1.665</b>	

Tab. 3: Übersicht über die Verteilung der Seren der Studiengruppe in den Altersgruppen und Unterteilung nach Geschlecht.

Alter der Pro- banden (Jahre)	Anzahl der Probanden	Prozent	Männlich	Prozent	weiblich	Prozent
0-2	272	16,3	151	55,5	121	44,5
3-4	175	10,5	104	59,4	71	40,6
5-6	151	9,1	74	49,0	77	51,0
7-8	175	10,5	89	50,9	86	49,1
9-10	192	11,5	97	50,5	95	49,5
11-12	201	12,1	100	49,8	101	50,2
13-14	224	13,5	112	50,0	112	50,0
15-17	275	16,5	113	41,1	162	58,9
<b>Summe</b>	<b>1.665</b>	<b>100,0</b>	<b>840</b>	<b>50,5</b>	<b>825</b>	<b>49,5</b>

Wie in Tab. 3 dargestellt, stammten die 1.665 Serumproben von Probanden im Alter von 0 bis 17 Jahren. Es erfolgte die Einteilung in 8 Altersgruppen, sodass die Mindestanzahl an Probanden pro Altersgruppe 150 betrug. Seren von 840 (50,5%) Jungen und 825 (49,5%) Mädchen wurden analysiert.

#### 4.1.2 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe standen insgesamt 400 Serumproben von gesunden Blutspendern im Alter von 18 bis 65 Jahren zur Verfügung. Davon stammten 337 Seren (84,3%) von Blutspendern aus Münster. Diese wurden vom Deutschen Roten Kreuz Münster von

Oktober bis Dezember 2010 entnommen. Weitere 63 Seren (15,7%) waren von Blutspendern aus Hannover und wurden vom Deutschen Roten Kreuz Hannover von März bis August 2011 rekrutiert. Die Entnahme der Proben erfolgte anonym, und die Einverständniserklärung der Probanden wurde eingeholt. Auch die Genehmigung der zuständigen Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität mit der Nr. „FSU 3142-05/11“ zur Verwendung der Seren wurde im Oktober 2011 gewährt. Die Entnahme von Folgeseren war nicht möglich. Informationen zum Influenza-Impfstatus standen nicht zur Verfügung. Alle Serumproben lagerten seit ihrer Gewinnung ohne Unterbrechung der Kühlkette bei -20°C.

Tabelle 4 stellt die Geschlechtsverteilungen und die Probenanzahl in den verschiedenen Altersgruppen der Kontrollgruppe dar. Von den 400 Vergleichsprobanden waren 229 (57,3%) männlich und 171 (42,7%) weiblich. Die Probanden wurden in drei etwa gleich große Altersgruppen eingeteilt, die zudem eine Mindestgröße von 100 Probanden haben sollten.

Tab. 4: Übersicht über die Häufigkeits- und Geschlechtsverteilung der Kontrollgruppe in den Altersgruppen.

Alter der Probanden (Jahre)	Anzahl der Probanden	Prozent	männlich	Prozent	weiblich	Prozent
18-29	151	37,8	79	52,3	72	47,7
30-45	124	31,0	72	58,1	52	41,9
46-65	125	31,2	78	62,4	47	37,6
Summe	400	100,0	229	57,3	171	42,7

## 4.2 Qualitative und semiquantitative Bestimmung von Influenza A- und B-spezifischem Immunglobulin G

### 4.2.1 Testprinzip des indirekten Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der ELISA ist eine immunologische Methode, die zumeist für die Bestimmung von spezifischen Antikörpern, aber auch zur Bestimmung spezifischer Antigene eingesetzt wird. Dabei sind spezifische Antigene oder Antikörper gegen den zu bestimmenden Antikörper oder das zu bestimmende Antigen an einen Träger wie z.B. Zellulose oder Polystyrol gebunden. Nach der Antigen-Antikörper-Reaktion werden die Immunkomplexe durch einen weiteren Antikörper detektiert. Dieser ist mit einem

Enzym gekoppelt. Das Ergebnis wird nach Reaktion mit einem chromogenen Substrat photometrisch bestimmt [Feldkamp et al. 2004]. Die Konzentrationsänderung des durch die enzymatische Reaktion entstandenen chromogenen Reaktionsproduktes kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz mit einem Photometer verfolgt werden. Die Intensität der Farbe steigt dabei mit der Konzentration des entstandenen Produktes und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Antikörpers in der Probe im Vergleich mit einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen. Eine anschauliche Animation zum Prinzip des ELISA ist auf der Homepage von Sumanas Inc über folgenden Link zu sehen: <http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/content/ELISA.html>.

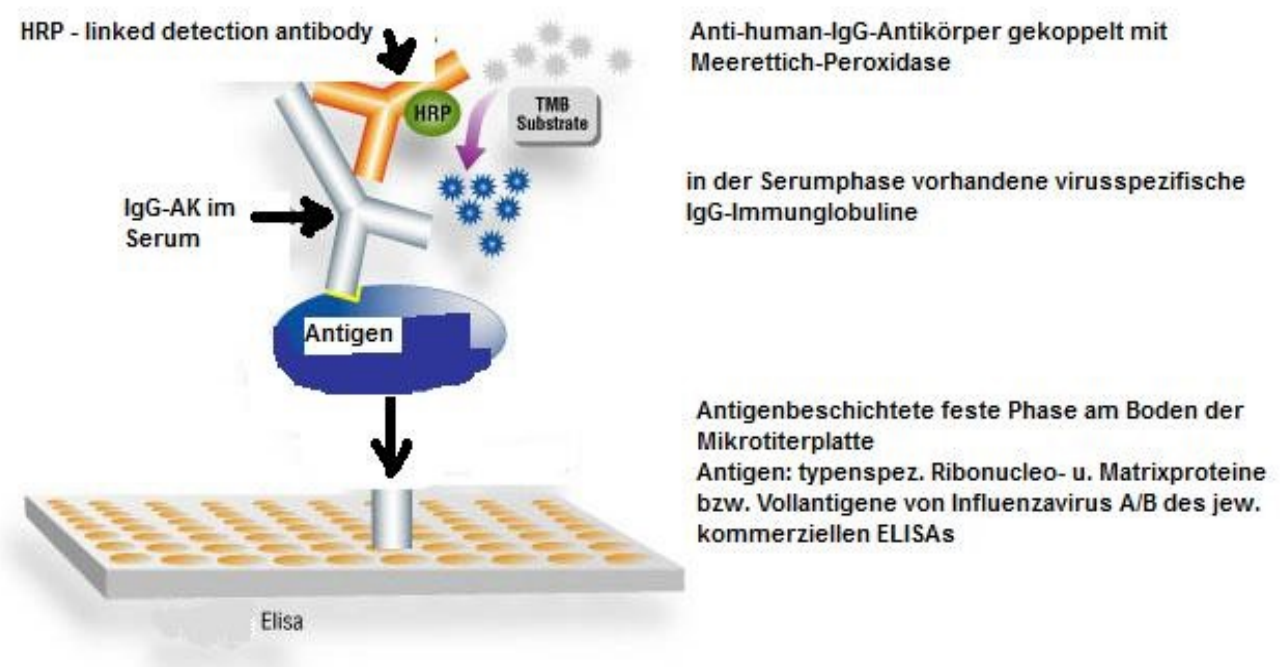


Abb. 4: Schematische Darstellung des Testprinzips der indirekten ELISA-Technik. TMB – Tetramethylbenzidin; HRP – horseradish peroxidase (engl.) = Meerrettich-Peroxidase; AK – Antikörper.

Die in der Studie verwendeten ELISAs der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL beruhen auf dem Prinzip der indirekten ELISA-Technik, die in Abb. 4 vereinfacht dargestellt ist. Die mit spezifischen Antigenen von IVA bzw. IVB beschichteten Böden der Kavitäten der Mikrotiterplatte stellen die solide Phase des Tests dar. Virusspezifische IgG-Antikörper der Serumprobe binden an die immobilisierten Antigene der Mikrotiterplatte. Ist die Probe positiv, bilden sich durch Zugabe von Anti-human-IgG-Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase (MRP) als Enzym konjugiert

sind, Antigen-Antikörper-Komplexe. Das Aktivitätszentrum der MRP stellt eine eisenhaltige Hämgruppe dar. Diese ist in der Lage, einen Komplex mit dem Substrat Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu bilden. In Anwesenheit des Elektronendonators 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) als chromogene Substanz zerfällt dieser Komplex unter Bildung von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Die chemische Reaktion wird in Abb. 5 dargestellt. Darüber hinaus wird die MRP in aktiver Form frei und der Elektronendonator wird oxidiert. Dadurch kommt es zum Umschlag der farblosen Lösung nach blau. Das Reaktionsprodukt ist stabil, unlöslich und blaugefärbt. Die ablaufende enzymatische Reaktion wird nach entsprechender Inkubationszeit mittels Schwefelsäure abgestoppt. Hierbei tritt ein Farbumschlag von blau nach gelb ein, der mittels Spektrophotometer bei 450 nm gemessen werden kann. Die optische Dichte des Endproduktes bei 450 nm ist zur Konzentration der spezifisch gebundenen Antikörper direkt proportional. Als Referenz wird zusätzlich mit dem 620 nm-Filter des Spektrophotometers die optische Dichte gemessen.

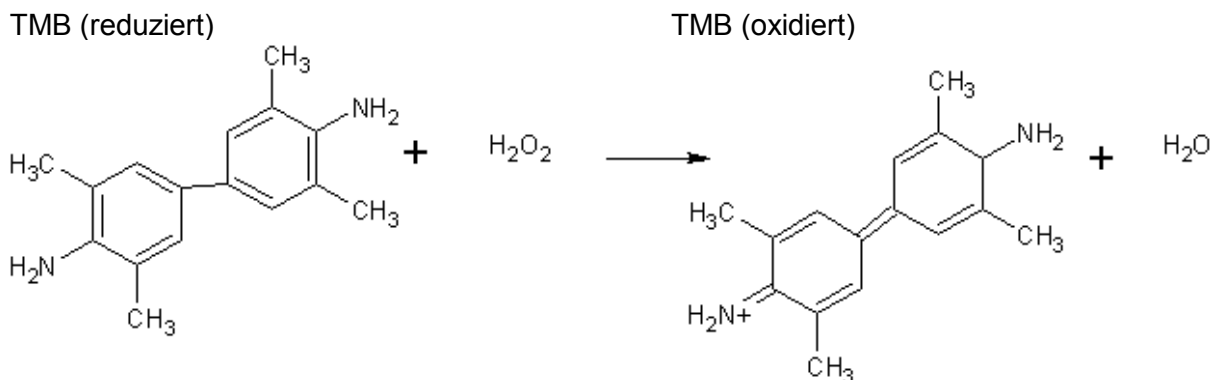


Abb. 5: Darstellung der chemischen Reaktion von 3,3', 5,5 Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) zu oxidiertem TMB und Wasser unter der Katalyse von Meerrettichperoxidase.

#### 4.2.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von NovaTec

##### Testprinzip und verwendete Chargen

Der qualitative und semiquantitative Nachweis der IgG-Antikörper gegen IVA und IVB in den humanen Seren wurde mit den IVA-ELISAs (Artikel-Nr. INFG 0290, Ch.-B. INFAG-061 und INFAG-062) und den IVB-ELISAs (Artikel-Nr. INFG 0300, Ch.-B. INFBG-074 und INFBG-077) der Firma NovaTec Immundiagnostica GmbH, Dietzenbach, durchgeführt. Die Teste beruhten auf dem in Abschnitt 4.2.1 erläuterten

Prinzip der indirekten ELISA-Technik. Sie arbeiten mit typspezifischen MP- und RNP-Antigenen von IVA [Stamm Texas 1/77-H3N2] und IVB [Stamm Hong Kong 5/72].

### Reagenzien, Materialien und Geräte

Im Anhang sind in Tab. A1 alle mitgelieferten Reagenzien zu den jeweiligen Kitsystemen aufgeführt. Die weiteren Materialien, Geräte und Hilfsmittel, die zur Arbeit mit den ELISAs von NovaTec erforderlich waren, sind im Anhang, Tab. A2 erfasst.

### Testmerkmale

Die verwendeten ELISAs wurden nach Angaben des Herstellers hinsichtlich ihrer diagnostischen Spezifität und Sensitivität mit entsprechenden ELISAs der Firma VIRO-IMMUN Labor-Diagnostika GmbH, Oberursel, verglichen (Tab. 5).

Tab. 5: Diagnostische Sensitivität und Spezifität des IVA- und IVB-IgG-AK-ELISAs von NovaTec.

ELISA	Sensitivität (Prozent)	Spezifität (Prozent)
IVA-IgG-AK	>95	>91,7
IVB-IgG-AK	95,8	86,7

### Testdurchführung

Vor jedem Probendurchlauf wurden die Kits, die bei 2-8°C im Kühlraum lagerten, auf Zimmertemperatur gebracht. Dies wurde entweder durch eine Wartezeit von etwa 90 min gewährleistet, oder die Lösungen wurden im Wasserbad bei 37°C für etwa 30 min erwärmt. Auch die zu bestimmenden Proben, die bei -20°C im Kühlfach lagerten, wurden durch eine Wartezeit von 90 min auf Zimmertemperatur gebracht. Vor Testbeginn wurden die Serumproben im Verhältnis 1+100 mit IgG-Probenverdünnungspuffer verdünnt. Dies erfolgte, indem 10 µl Probe und 1 ml Probenverdünnungspuffer in die vorbereiteten Probenverdünnungsröhrchen pipettiert wurde (Abb. 6).



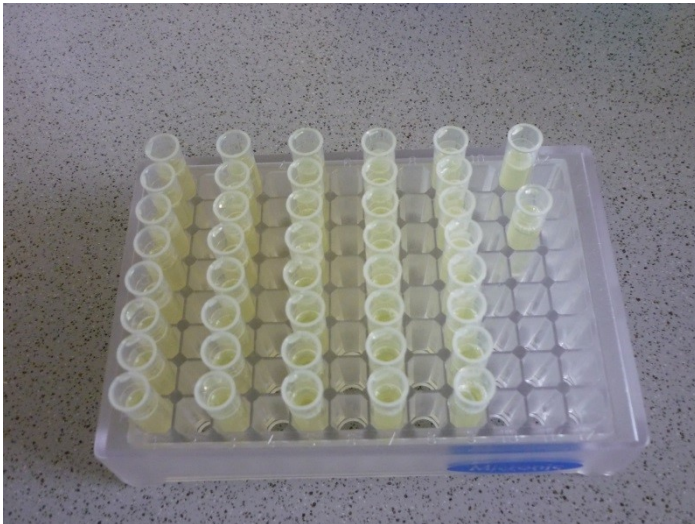


Abb. 6: Probenverdünnung 1+100 mit Probenpuffer in Verdünnungsröhrchen.

Anschließend wurden beide Komponenten gut durchmischt und die Proben entsprechend dem Schema der Abb. 6 zu je 100 µl in die vorgesehenen Kavitäten A2 bis D12 pipettiert. Vor diesem Schritt wurden die im Kit enthaltenen Kontrollen in die Kavitäten B1 bis E1 eingebracht. Kavität A1 diente als Blank- / Substratleerwert. In die B1-Vertiefung wurden 100 µl Negativkontrolle und in die Kavitäten C1 und D1 jeweils 100 µl der Cut-off-Kontrollen pipettiert. Die Positivkontrolle wurde mit 100 µl in E1 eingebracht. Abb. 7 zeigt eine schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte, wie sie in den Probendurchläufen bestückt wurde. Die Probenbestimmungen erfolgten in Doppelbestimmung.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9	Probe 17	Probe 17	Probe 25	Probe 25	Probe 33	Probe 33	Probe 41
B	Neg	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10	Probe 18	Probe 18	Probe 26	Probe 26	Probe 34	Probe 34	Probe 41
C	Cut-off	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11	Probe 19	Probe 19	Probe 27	Probe 27	Probe 35	Probe 35	Probe 42
D	Cut-off	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12	Probe 20	Probe 20	Probe 28	Probe 28	Probe 36	Probe 36	Probe 42
E	Pos	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13	Probe 21	Probe 21	Probe 29	Probe 29	Probe 37	Probe 37	
F		Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14	Probe 22	Probe 22	Probe 30	Probe 30	Probe 38	Probe 38	
G		Probe 7	Probe 7	Probe 15	Probe 15	Probe 23	Probe 23	Probe 31	Probe 31	Probe 39	Probe 39	
H		Probe 8	Probe 8	Probe 16	Probe 16	Probe 24	Probe 24	Probe 32	Probe 32	Probe 40	Probe 40	

Abb. 7: Schematische Darstellung einer für die Probenläufe bestückten Mikrotiterplatte mit 12 x 8 Kavitäten für den NovaTec-ELISA.

Nach dem Einbringen der Kontrollen und Probenverdünnungen wurden die Streifen mit Abdeckfolie bedeckt und für eine Inkubationszeit von 1 h +/- 5 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Abdeckfolie entfernt und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen mithilfe eines automatischen Strip-Washers abgesaugt und anschließend 5mal mit 350 µl Waschlösung, die im Verhältnis 1 + 19 mit Aqua dest. verdünnt wurde, gewaschen. Überschüssige, nicht gebundene Influenzavirus-spezifische IgG-Antikörper der Proben und Kontrollen wurden auf diese Weise entfernt. Die Antikörper, die bereits an die solide Phase der IVA-/IVB-spezifischen Antigene der beschichteten Mikrotiterstreifen gebunden waren, wurden durch diesen Schritt nicht beeinflusst. Ein Überfließen von Flüssigkeiten aus den Vertiefungen wurde während des Waschens vermieden. Durch den Waschautomat und das spezielle Waschprogramm wurde ein Intervall von mindestens 5 sec zwischen Waschen und Absaugen eingehalten. Nach dem Waschgang wurden die Teststreifen mit den Öffnungen nach unten kurz auf Fließpapier ausgeklopft, um restliche Flüssigkeit zu entfernen. Anschließend wurden 100 µl IVA- bzw. IVB-anti-IgG-Konjugat in alle Vertiefungen, mit Ausnahme der für die Berechnung des Leerwertes (A1) vorgesehenen, pipettiert und mit Folie abgedeckt. Es bildeten sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die aus IVA-/IVB-spezifischen Antigenen, humanen IVA-/IVB-IgG-Antikörpern und Meerettich-Peroxidase-konjugierten Anti-IgG-Antikörpern bestanden. Es folgte eine Inkubationsphase von 30 min bei Raumtemperatur (20 – 25°C), wobei direkte Sonneneinstrahlung vermieden wurde. Dies wurde durch eine lichtundurchlässige Abdeckung der Mikrotiterplatte gewährleistet. Anschließend wiederholte sich der oben beschriebene Waschvorgang, um die Restflüssigkeit aus den Kavitäten zu entfernen. Nur die Antigen-Antikörper-Komplexe blieben zurück. Nach dem Waschgang wurden 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettiert, um die Antigen-Antikörper-Komplexe farblich sichtbar zu machen. Nach Oxidation des TMB durch das Vorhandensein von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde das farblose Substrat blau gefärbt. Dieser Reaktionsschritt erfolgte innerhalb einer Inkubationszeit von 15 min ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Vermeidung direkter Sonneneinstrahlung. Nach Ablauf dieser Zeit wurde in alle Vertiefungen 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei der TMB-Substratlösung pipettiert. Das sich während der Inkubation gebildete blaue Reaktionsprodukt nahm durch die Zugabe der Stopplösung die Farbe gelb an (Abb. 8).

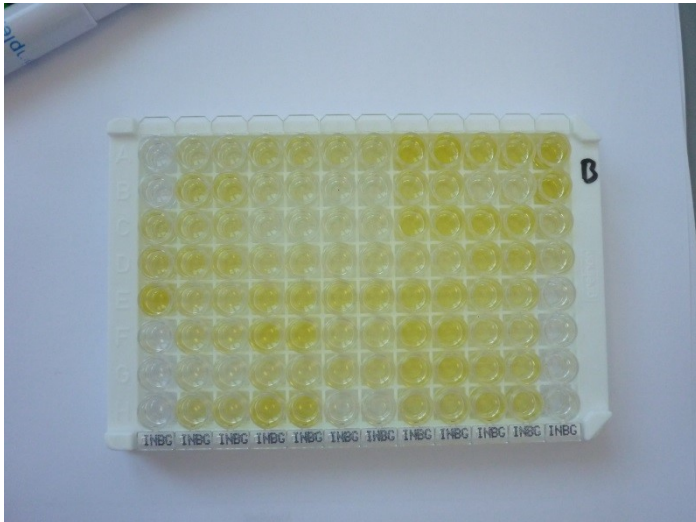


Abb. 8: Mikrotiterplatte eines NovaTec IVB-ELISAs nach Zugabe der Stopplösung. Je intensiver die Gelbfärbung, desto höher die Extinktion der Probe und desto höher die Antikörperkonzentration.

Die photometrische Auswertung erfolgte mit dem TECAN Reader innerhalb von 30 min nach Zugabe der Stopplösung. Die Extinktionen aller Kavitäten der Mikrotiterstreifen wurden mit dem 450 nm-Filter gegen den 620 nm-Filter als Referenz gemessen und die Ergebnisse ausgedruckt. Mit Hilfe des Substratleerwertes (Blank) in Kavität A1 wurde der Nullabgleich des ELISA-Readers vorgenommen. Zur Testauswertung wurden die Mittelwerte der Extinktionswerte gebildet, da die Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

### Testgültigkeitskriterien

Vom Testhersteller NovaTec wurden folgende, in Tab. 6 zusammengefasste Testgültigkeitskriterien festgelegt. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, war der Testlauf ungültig und musste wiederholt werden.

Tab. 6: Testgültigkeitskriterien des IVA- und IVB-ELISAs von NovaTec.

Kontrolle	Kavität	Erforderliche Extinktion
Substrat - Leerwert (Blank)	A1	< 0,100
Negativ – Kontrolle	B1	< 0,200 und < Cut-off
Cut - off – Kontrolle	C1 und D1	0,150 - 1,300
Positiv – Kontrolle	E1	> Cut-off

### Qualitative Testauswertung

Serumproben galten als positiv, wenn der Extinktionswert >10% oberhalb des Cut-offs lag, wobei als Cut-off-Wert der Mittelwert aus den ermittelten Extinktionen der beiden mitgeführten Cut-off-Kontrollen errechnet wurde. Getestete Proben mit

Extinktionswerten von  $\leq 10\%$  über bzw. unter dem Cut-off konnten nicht eindeutig als positiv bzw. negativ zugeordnet werden und wurden als grenzwertig angesehen. Untersuchungsproben galten als negativ, wenn der Extinktionswert  $> 10\%$  unterhalb des Cut-off-Wertes lag (Tab. 7).

Tab. 7: Kriterien für die qualitative Auswertung des IVA- und IVB-ELISAs von NoveTec.

Qualitatives Ergebnis	Extinktion der Proben im Vgl. zum Cut-off-Mittelwert
Positiv	$> \text{Cut-off} + 10\%$ ( $> \text{Cut-off} \times 1,1$ )
Grenzwertig	$\leq \text{Cut-off} + 10\%$ ( $\leq \text{Cut-off} \times 1,1$ ) UND $\geq \text{Cut-off} - 10\%$ ( $\geq \text{Cut-off} \times 0,9$ )
Negativ	$< \text{Cut-off} - 10\%$ ( $< \text{Cut-off} \times 0,9$ )

Von jeder Serumprobe wurde in Doppelbestimmung deren Extinktion gemessen. Dabei mussten die Einzelmessungen die gleichen qualitativen Ergebnisse vorweisen, um in der Gesamtheit als positiv, grenzwertig oder negativ gewertet zu werden. War dies nicht der Fall, so wurde der Test für diese Serumproben in Einzelbestimmung wiederholt. Ein ausführliches Bewertungsschema zeigt Abb. A1 im Anhang.

### Semiquantitative Testauswertung

Zur semiquantitativen Testauswertung wurden die Extinktionen der Proben in arbiträre NovaTec-Einheiten (NTU) umgerechnet. Als Bezugspunkt galt der Cut-off-Mittelwert. Auf diese Weise war eine relative Quantifizierung innerhalb des Tests möglich. Die NTU wurden entsprechend folgender Formel ermittelt:

$\frac{\text{Mittlere Extinktion der Serumprobe} \times 10}{\text{Cut-off-Mittelwert}} = [\text{NovaTec-Units} = \text{NTU}]$
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Die Beziehung der semiquantitativen Testergebnisse zu den qualitativen Befunden stellt Tab. 8 dar.

Tab. 8: Bezug der qualitativen Befunde zu den semiquantitativen Befunden.

Qualitative Ergebnisse	Semiquantitative Befunde (NTU)
Negativ	$< 9$
Cut-off-Mittelwert	10
Grenzwertig (Grauzone)	9 – 11
Positiv	$> 11$

Lag die ermittelte Extinktion höher als das vom Photometer messbare Maximum, wurde das Ergebnis als „Überlauf“ angegeben. Diese Proben wurden nochmals mit

einer Probenverdünnung 1 + 200 (5 µl Serum + 1 ml Probenverdünnungspuffer) getestet und anschließend zur Berechnung der Antikörperkonzentration in NTU mit dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert. War ein weiterer Verdünnungsschritt notwendig (2,5 µl + 1 ml Probenverdünnungspuffer), so wurde mit dem Verdünnungsfaktor 4 die Antikörperkonzentration berechnet.

#### **4.2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von Euroimmun**

##### **Testprinzip und verwendete Chargen**

Der qualitative und quantitative Nachweis der IgG-Antikörpern gegen IVA und IVB in den humanen Seren wurde mit den IVA-ELISAs (Artikel-Nr. EI 2691-9601 G, Ch.-B. E110905AO und E120119BO) und den IVB-ELISAs (Artikel-Nr. EI2692-9601G, Ch.-B. E110826AY, E110004AO, E120202AG) der Firma Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Lübeck, durchgeführt. Die qualitative Bestimmung beruht auf dem in Abschnitt 4.2.1 erläuterten Prinzip der indirekten ELISA-Technik. Die ELISAs von Euroimmun arbeiten mit typspezifischen Vollantigenen mit hohem Anteil an MP- und NP-Antigen. Der IVA-ELISA enthält inaktiviertes IVA Stamm Texas (H3N2), Stamm Singapore (H1N1) und Stamm California (porcines H1N1). Der IVB ELISA enthält inaktiviertes IVB Stamm Hong Kong 5/72.

##### **Reagenzien, Materialien und Geräte**

Im Anhang sind alle mitgelieferten Reagenzien zu den jeweiligen Kitsystemen aufgeführt (Tab. A3). Die weiteren Materialien, Geräte und Hilfsmittel, die zur Arbeit mit den ELISAs von Euroimmun erforderlich waren, sind ebenfalls im Anhang erfasst (Tab. A2). Die Testkits wurden bei 2-8°C aufbewahrt.

##### **Testmerkmale**

##### **Kalibrierung**

Da für den Nachweis der Antikörper sowohl gegen IVA als auch gegen IVB kein internationales Referenzserum vorliegt, wurde die Kalibrierung in relativen Einheiten (RE/ml) vorgenommen. Bei jedem Testansatz mussten die Extinktionswerte der Kalibratoren sowie die relativen Einheiten der positiven und der negativen Kontrolle innerhalb der für jede Charge angegebenen Toleranzwerte (Protokoll mit

Sollwertvorgaben) liegen. Wenn diese Anforderungen an die Kontrollen nicht erfüllt waren, könnten die Testergebnisse ungenau sein und der Test musste wiederholt werden.

### ***Linearität, Nachweisempfindlichkeit und Kreuzreaktivität***

Zur Bestimmung der Linearität des Tests wurden Verdünnungsreihen von Patientenproben mit hohen Antikörperkonzentrationen untersucht. Sowohl der IVA-ELISA als auch der IVB-ELISA ist im Messbereich von 2 bis 200 RE/ml linear. Die untere Nachweisgrenze ist definiert als der Wert der dreifachen Standardabweichung einer analytfreien Probe und gibt den geringsten eindeutigen erfassbaren Antikörpertiter an. Sie liegt bei 1 RE/ml. Für die verwendeten IVA-/IVB-ELISAs ist nach Herstellerangaben eine mögliche Kreuzreaktivität untereinander bekannt.

### ***Referenzbereich***

Die Konzentrationen der IVA-Antikörper wurden bei 500 gesunden Blutspendern ermittelt. Bei einem Cut-off von 20 RE/ml waren 90,6% der Blutspender IVA-IgG-positiv. Die Konzentration der IVB-Antikörper wurde bei 300 gesunden Blutspendern ermittelt. Bei einem Cut-off von 20 RE/ml waren 76,7% der Blutspender IVB-IgG-positiv.

### ***Testdurchführung***

Die Durchführung des Tests erfolgte in den gleichen Schritten, wie sie in Abschnitt 4.2.2 bei NovaTec beschrieben sind. An dieser Stelle werden nur die Abweichungen vom NovaTec-ELISA näher erläutert. Die Abb. 9 zeigt eine schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte, wie sie in den Probendurchläufen bestückt wurde. Die im Kit enthaltenen Kontrollen wurden in die Kavitäten A1 bis E1 pipettiert. In Kavität A1 wurden 100 µl Kalibrator 1, in Kavität B1 100 µl Kalibrator 2 und in Kavität C1 100 µl Kalibrator 3 pipettiert. In die D1-Vertiefung wurden 100 µl Positivkontrolle und in Vertiefung E1 100 µl Negativkontrolle pipettiert. Die Probenbestimmungen erfolgten in Doppelbestimmung. Nach dem Einbringen der Kontrollen und Probenverdünnungen wurden die Streifen mit Abdeckfolie bedeckt und 30 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert. Die zwei Waschschrte wurden jeweils 3mal mit 400 µl Waschlösung, die im Verhältnis 1 + 9 mit Aqua dest. verdünnt wurde, durchgeführt. Eine Mikrotiterplatte nach Zugabe der Stopplösung und vor der Messung der optischen

Dichte zeigt Abb. 10. Die photometrische Auswertung erfolgte mit dem TECAN Reader. Zur Testauswertung sind die Mittelwerte der Extinktionswerte gebildet worden, da die Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K1 200RE/ml	Probe 1	Probe 1	Probe 9	Probe 9	Probe 17	Probe 17	Probe 25	Probe 25	Probe 33	Probe 33	Probe 41
B	K2 20 RE/ml	Probe 2	Probe 2	Probe 10	Probe 10	Probe 18	Probe 18	Probe 26	Probe 26	Probe 34	Probe 34	Probe 41
C	K3 2 RE/ml	Probe 3	Probe 3	Probe 11	Probe 11	Probe 19	Probe 19	Probe 27	Probe 27	Probe 35	Probe 35	Probe 42
D	Pos	Probe 4	Probe 4	Probe 12	Probe 12	Probe 20	Probe 20	Probe 28	Probe 28	Probe 36	Probe 36	Probe 42
E	Neg	Probe 5	Probe 5	Probe 13	Probe 13	Probe 21	Probe 21	Probe 29	Probe 29	Probe 37	Probe 37	
F		Probe 6	Probe 6	Probe 14	Probe 14	Probe 22	Probe 22	Probe 30	Probe 30	Probe 38	Probe 38	
G		Probe 7	Probe 7	Probe 15	Probe 15	Probe 23	Probe 23	Probe 31	Probe 31	Probe 39	Probe 39	
H		Probe 8	Probe 8	Probe 16	Probe 16	Probe 24	Probe 24	Probe 32	Probe 32	Probe 40	Probe 40	

Abb. 9: Schematische Darstellung einer für die Probenläufe bestückten Mikrotiterplatte mit 12 x 8 Kavitäten.

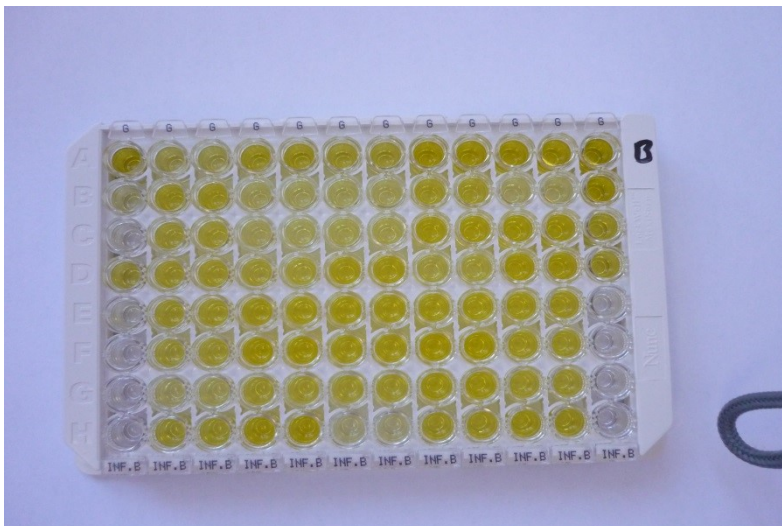


Abb. 10: Mikrotiterplatte eines Euroimmun IVB-ELISAs nach Zugabe der Stopplösung. Je intensiver die Gelbfärbung, desto höher die Extinktion der Probe und desto höher die Antikörperkonzentration.

### Testgültigkeitskriterien

Ein Testdurchlauf galt als gültig, wenn die mitgelieferten Kalibratoren und Kontrollen bestimmte Qualitätskontrollen erfüllten. Diese waren auf dem mit dem Test mitgeliefertem Qualitätskontrollzertifikat festgehalten. Dieses Zertifikat war sowohl für den IVA-ELISA und dem IVB-ELISA als auch für die jeweils verwendete Charge



unterschiedlich. Eine Darstellung zu den Gültigkeitskriterien der einzelnen Tests und Chargen gibt Tab. A5 im Anhang. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, war der Testlauf ungültig und musste wiederholt werden.

### Qualitative und quantitative Testauswertung

Nach Auftragen der gemessenen Extinktionen für die 3 Kalibratoren gegen die entsprechenden Konzentrationen (linear / linear) wurde eine Standardkurve erstellt, mit deren Hilfe die Antikörperkonzentrationen der unbekannten Serumproben ermittelt werden konnten. Zur computergesteuerten Berechnung der Standardkurve musste dazu das Auswertungsverfahren „Punkt zu Punkt“ gewählt werden. Abb. 11 zeigt ein typisches Beispiel für solch eine Standardkurve. Lag die Konzentration einer Serumprobe oberhalb des Kalibrators 1 (200 RE/ml), so wurde das Ergebnis mit „>Max“ bzw. „>200 RE/ml“ angegeben. Proben, bei denen dies der Fall war, könnten, um eine genaue quantitative Auswertung möglich zu machen, in einem neuen Testansatz mit einer Verdünnung 1:400 wiederholt gemessen werden. Das aus der Standardkurve ermittelte Ergebnis in RE/ml musste entsprechend diesem Beispiel dann noch mit dem Verdünnungsfaktor 4 multipliziert werden. Von solch einer Verdünnungsreihe wurde jedoch in dieser Studie abgesehen, da nur eine begrenzte Anzahl an ELISA-Kits zur Verfügung stand. Lag die Konzentration einer Serumprobe unterhalb des Kalibrators 2 (2 RE/ml), so wurde das Ergebnis mit „<Min“ bzw. „<2 RE/ml“ angegeben. Tabelle 9 zeigt die zur Testauswertung vorgenommene Befundinterpretation. Da die Probendurchläufe in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden, diente zur Konzentrationsberechnung laut Standardkurve der Mittelwert der Extinktionen. Für die qualitative Auswertung mussten die Einzelmessungen die gleichen Ergebnisse vorweisen, um in der Gesamtheit als positiv, grenzwertig oder negativ gewertet zu werden. War dies nicht der Fall, so wurde der Test für diese Serumproben in Einzelbestimmung wiederholt. Ein ausführliches Bewertungsschema zeigt Abb. A2 im Anhang.

Tab. 9: Befundinterpretation des Euroimmun-ELISAs.

Quantitativer Befund in RE/ml (Konzentration lt. Standardkurve)	Qualitatives Befundergebnis
< 16 RE/ml	NEGATIV
≥ 16 bis < 22 RE/ml	GRENZWERTIG
≥ 22 RE/ml	POSITIV



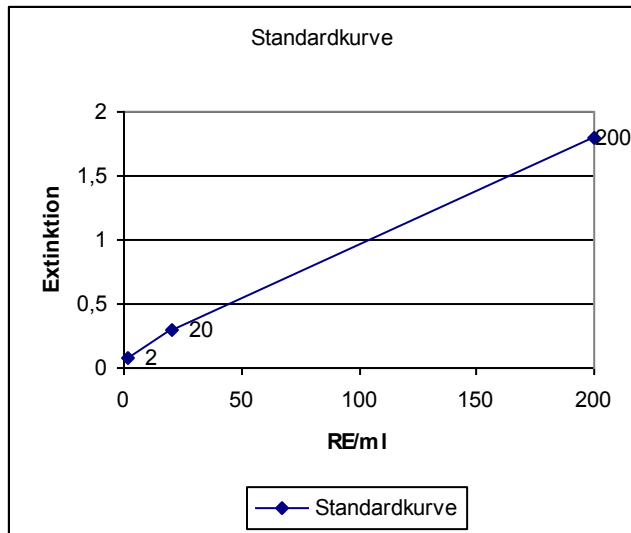


Abb. 11: Standardkurve der gemessenen Extinktionen der Kalibratoren gegen die entsprechenden Konzentrationen.

#### 4.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IBL

##### Testprinzip und verwendete Chargen

Der qualitative und semiquantitative Nachweis der IgG-Antikörper gegen IVA und IVB in den humanen Seren wurde mit den IVA-ELISAs (Artikel-Nr. RE56511, Ch.-B. IAG-199) und den IVB-ELISAs (Artikel-Nr. RE56541, Ch.-B. IBG-181) der Firma IBL International GmbH Hamburg durchgeführt. Die qualitative Bestimmung beruht auf dem in Abschnitt 4.2.1 erläuterten Prinzip der indirekten ELISA-Technik. Nach Angaben des Herstellers verwenden die ELISAs inaktiviertes IVA Sydney/5/97 (H3N2) und Beijing/262/95 (H1N1) sowie inaktiviertes IVB Harbin/7/94 mit einem hohen Anteil an MP und NP als Antigen, das an die Festphase immobilisiert ist. Die Virusinaktivierung und Freisetzung der typspezifischen Bestandteile erfolgte mittels Oktanoat.

##### Reagenzien, Geräte und Materialien

Im Anhang sind alle mitgelieferten Reagenzien zu den jeweiligen Kitsystemen aufgeführt (Tab. A4). Die weiteren Materialien, Geräte und Hilfsmittel, die zur Arbeit mit den ELISAs von IBL erforderlich waren, sind im Anhang ebenfalls erfasst (Tab. A2). Die Testkits wurden bei 2-8°C aufbewahrt.

## Testmerkmale

### Normwerte

In einer Firmen-internen Studie zeigten offensichtlich gesunde Probanden folgende in Tab. 10 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 10: Befundergebnisse der Firmen-internen Studie mit gesunden Probanden.

IVA / IVB-IgG-AK	n	Interpretation		
		Positiv	Grenzwertig	Negativ
IVA-IgG-AK	56	73,2%	16,1%	10,7%
IVB-IgG-AK	56	78,4%	11,4%	10,2%

### Analytische Spezifität (Kreuzreaktivität)

Es wurden keine Kreuzreaktivitäten gegen RSV, Adenovirus und Parainfluenza-Virus 1,2 und 3 gefunden.

### Diagnostische Sensitivität und Spezifität

IBL gibt sowohl für den IVA- als auch den IVB-IgG-ELISA eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von jeweils über 95% an. Allerdings werden keine Angaben gemacht, mit welchem diagnostischen Test verglichen wurde.

## Testdurchführung

Die Durchführung des Tests erfolgte in den gleichen Schritten, wie sie in Abschnitt 4.2.2 bei NovaTec beschrieben sind. An dieser Stelle werden nur die Abweichungen vom NovaTec-ELISA näher erläutert.

Die Abb. 12 zeigt eine schematische Darstellung einer Mikrotiterplatte, wie sie in den Probendurchläufen bestückt wurde. Entsprechend dem Schema der Abb. 11 wurden die Probenverdünnungen zu je 100 µl in die vorgesehenen Kavitäten G1 bis H6 pipettiert. Vor diesem Schritt wurden die im Kit enthaltenen Standards A-D in die Kavitäten A1 bis D1 mit jeweils 100 µl eingebracht. Die Probenbestimmungen erfolgten in Einzelbestimmung, da nur eine begrenzte Anzahl an Kits zur Verfügung stand. Nach dem Einbringen der Kontrollen und Probenverdünnungen wurden die Streifen mit Abdeckfolie bedeckt und für eine Inkubationszeit von 1 h +/- 5 min bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubiert. Die zwei Waschschrte wurden jeweils 3mal mit 400 µl Waschlösung, die im Verhältnis 1 + 10 mit Aqua dest. verdünnt wurde, durchgeführt.

Außerdem betrug die Inkubationszeit zwischen der Zugabe der TMB – Substratlösung und der Stopplösung 20 min. Die photometrische Auswertung erfolgte mit dem TECAN Reader.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S_A 1 U/ml	Probe 3	Probe 11	Probe 19	Probe 27	Probe 35						
B	S_B 10 U/ml	Probe 4	Probe 12	Probe 20	Probe 28	Probe 36						
C	S_C 50 U/ml	Probe 5	Probe 13	Probe 21	Probe 29	Probe 37						
D	S_D 150/175 U/ml	Probe 6	Probe 14	Probe 22	Probe 30	Probe 38						
E		Probe 7	Probe 15	Probe 23	Probe 31	Probe 39						
F		Probe 8	Probe 16	Probe 24	Probe 32	Probe 40						
G	Probe 1	Probe 9	Probe 17	Probe 25	Probe 33	Probe 41						
H	Probe 2	Probe 10	Probe 18	Probe 26	Probe 34	Probe 42						

Abb. 12: Schematische Darstellung einer für die Probenläufe bestückten Mikrotiterplatte mit 6 x 8 Kavitäten.

### Testgültigkeitskriterien

Ein Testdurchlauf galt als gültig, wenn die Standards/Kontrollen bestimmte Qualitätskontrollen erfüllten. Diese waren auf dem mit dem Test mitgelieferten Qualitätskontrollzertifikat festgehalten. Dieses Zertifikat war sowohl für den IVA-ELISA und den IVB-ELISA als auch für die jeweils verwendete Charge unterschiedlich. Eine Darstellung zu den Gültigkeitskriterien der einzelnen Tests gibt Tab. 11. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, war der Testlauf ungültig und musste wiederholt werden.

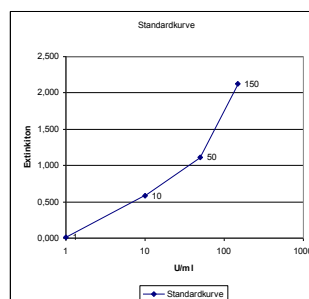
Tab. 11: Validierungskriterien der IBL-ELISAs.

Validierungskriterien für IVA-/IVB-IgG-ELISAs von IBL				
IVA-/IVB-ELISA	Kalibrator	Konzentration in U/ml	Referenzwert in OD	Valider Bereich in OD
Influenza A	Kalibrator 1	1	0,005	$\leq 0,150$
	Kalibrator 2	10	0,445	$\geq 0,200$
	Kalibrator 3	50	0,96	$\geq 0,450$
	Kalibrator 4	150	1,867	$\geq 1,000$
Influenza B	Kalibrator 1	1	0,016	$\leq 0,150$
	Kalibrator 2	10	0,571	$\geq 0,200$
	Kalibrator 3	50	1,188	$\geq 0,450$
	Kalibrator 4	175	2,212	$\geq 1,000$

### Qualitative und quantitative Testauswertung

Die erhaltenen Extinktionen der Standards (y-Achse, linear) wurden gegen deren Konzentrationen (x-Achse, logarithmisch) durch ein entsprechendes Computerprogramm (magellan-Software, s. Geräte 4.2.4.3) aufgetragen. Die ermittelten Antikörperkonzentrationen konnten direkt von der Standardkurve abgelesen werden (in diesem Fall durch das Computerprogramm). Die standardmäßige Verdünnung war in dem oben beschriebenen Auswertungsverfahren bereits berücksichtigt. Wenn Proben weiter verdünnt wurden, mussten die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Für Proben, die oberhalb des höchsten Standards gemessen wurden (für IVA 150 U/ml und für IVB 175 U/ml), wurde als Ergebnis „>Max“ angegeben. Weitere Durchläufe (mit stärkerer Verdünnung) zur exakten quantitativen Auswertung für Proben, deren Ergebnis „>Max“ war, wurde aufgrund der hohen Anzahl dieser Serien und der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Testkits nicht durchgeführt. Für Proben, die unterhalb des kleinsten Standards gemessen wurden (1 U/ml), wurde als Ergebnis „<Min“ angegeben. Eine typische Standardkurve am Beispiel eines IVA-ELISAs von IBL zeigt Tab.12 und Abb. 13.

Standard	U/ml	Extinktion
A	1	0,010
B	10	0,585
C	50	1,111
D	150	2,128



Tab. 12 u. Abb. 13: Typische Standardkurve mit den entsprechenden Extinktionswerten zur Testauswertung eines IBL-ELISAs.

### Interpretation der Ergebnisse

Die quantitative Interpretation der Befunde erfolgte entsprechend dem Schema von Tab. 13.

Tab. 13: Befundinterpretation der IVA-/IVB-IgG-ELISAs von IBL nach quantitativer Methode (Standardkurve).

Quantitative Methode	Bereich	Interpretation
Standardkurve	< 8 U/ml	NEGATIV
	8 – 12 U/ml	GRENZWERTIG
	> 12 U/ml	POSITIV

### 4.3 Statistische Methoden

#### **Zielgrößen**

Die Prävalenzschätzung IVA- und IVB-spezifischer Antikörper bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 bis 17 Jahren war das **primäre Ziel** der Studie. **Sekundäre Zielkriterien** waren Vergleiche von Antikörperprävalenz und Antikörperkonzentration zwischen den Alters- und Geschlechtsgruppen der Kinder und Jugendlichen sowie zwischen der Studiengruppe und einer Kontrollgruppe von erwachsenen Blutspendern. Des Weiteren wurde untersucht, ob es Unterschiede zwischen geimpften (saisonale Influenza und Schweinegrippe) und ungeimpften Probanden der Studiengruppe hinsichtlich der Antikörperprävalenzen gibt. Ebenso sollten bei den drei kommerziellen IgG-ELISAs die Korrelationen dieser untereinander berechnet werden (jeweils für die IVA- und IVB-ELISAs).

#### **Fallzahlschätzung**

Die Grundlage der Fallzahlschätzung waren die erreichbaren Genauigkeiten der Schätzungen für die altersgruppenspezifischen Antikörperprävalenzen. Bei einem Mindestumfang von 150 Probanden pro Altersgruppe der Kinder und Jugendlichen kann abhängig von der Höhe der Prävalenzen eine Genauigkeit der Konfidenzintervallschätzung zwischen +/- 3.5% und +/- 8% erzielt werden (Fallzahlplanungsprogramm nQuery Advisor 6.01, Firma Statistical Solutions Ltd.).

#### **Statistische Analysen**

##### ***Primäres Zielkriterium***

Zunächst sollte die Seroprävalenz durch den prozentualen Anteil positiver Testbefunde, bezogen auf die Gesamtzahl in der jeweiligen Gruppe, geschätzt werden. Unter der Annahme einer Binomialverteilung wurden zweiseitige exakte 95%-Konfidenzintervalle (95% CI mit Angabe der oberen und unteren Grenze in eckigen Klammern) berechnet [Sachs. 1984]. Die bei der Euroimmun- und IBL-Methode auftretenden Antikörperkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze ( $< \text{Min}$ ) wurden in der Antikörperbewertung als negativ gezählt. Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze ( $> \text{Max}$ ) wurden als positiv bewertet.

**Sekundäre Zielkriterien**

Innerhalb der Gruppe der Kinder und Jugendlichen sowie innerhalb der Kontrollgruppe wurde mittels Cochran-Armitage-Test [Armitage. 1955, Cochran. 1954] untersucht, ob die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt (linearer Trend). Mittels Mantel-Haenszel-Test [Wittes und Wallenstein. 1993] wurde geprüft, ob sich die Antikörperprävalenzen von männlichen und weiblichen Probanden unter Berücksichtigung des Alters unterscheiden. In logistischen Regressionsmodellen wurde auf der Grundlage der Wald-Statistik [Engle. 1993] geprüft, welche Altersgruppen der Kinder und Jugendlichen eine signifikant unterschiedliche Prävalenz im Vergleich zur gesamten Kontrollgruppe aufweisen. Neben der Antikörperprävalenz wurde die Antikörperkonzentration altersgruppen- und geschlechtsspezifisch mittels statistischer Kenngrößen beschrieben (Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Median, Interquartilbereich). Für Regressionsmodelle und statistische Vergleiche wurde die Antikörperkonzentration zur Annäherung an eine Normalverteilung logarithmisch transformiert. Innerhalb der Gruppe der Kinder und Jugendlichen sowie innerhalb der Kontrollgruppe wurde mittels linearer Regression der Einfluss von Alter (in Gruppen) und Geschlecht auf die Antikörperkonzentration untersucht. Altersgruppenspezifisch wurde die mittlere (logarithmierte) Antikörperkonzentration bei Kindern und Jugendlichen mit der gesamten Kontrolle mittels Dunnett-Test [Dunnett. 1955] verglichen. Die Serumproben aller Probanden wurden parallel nach dem Verfahren der Firmen Novatec, Euroimmun und IBL befundet. Alle statistischen Analyseverfahren wurden dementsprechend sowohl auf die NovaTec-Befunde als auch auf die Euroimmun- und IBL-Befunde angewendet.

1.396 Seren enthielten auch Informationen zum Impfstatus (saisonale und pandemische Influenza). Innerhalb der Gruppe der Geimpften sowie der Gruppe der Nicht-Geimpften wurde mittels Cochran-Armitage-Test untersucht, ob die Prävalenz mit zunehmendem Alter ansteigt (linearer Trend). In logistischen Regressionsmodellen wurde auf der Grundlage der Wald-Statistik geprüft, ob die Gruppe der Geimpften signifikant unterschiedliche Prävalenzen im Vergleich zur Gruppe der Nicht-Geimpften aufweisen. Außerdem wurden die Korrelationen der Seroprävalenzen der einzelnen kommerziellen Teste jeweils für IVA und IVB mittels des Kappa-Tests [Landis und Koch. 1977] berechnet. Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen SAS

(Version 9.2) und IBM SPSS Statistics (Version 20) durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

### **Datenmanagement**

Im Institut für Medizinische Statistik, Information und Dokumentation der Universitätsklinik Jena wurde eine Access-Datenbank mit Eingabemaske erstellt, validiert und im Institut für Virologie und Antivirale Therapie implementiert. Es erfolgte eine Erfassung und Kontrolle der Daten im Institut für Virologie und Antivirale Therapie. Darüber hinaus wurden Plausibilitätsprüfungen durchgeführt.

### **Erhobene Merkmale der analysierten Proben**

Die Merkmale der analysierten Proben der Studiengruppen und der Kontrollgruppe, die für die statistischen Berechnungen erfasst wurden, dokumentiert Tab. A6 im Anhang.

## 5 Ergebnisse

Eine Übersicht über die qualitativen Antikörperbefunde aller drei Teste sowohl für die Studien- als auch für die Kontrollgruppe geben die Tabellen A7 bis A9 im Anhang.

### 5.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von NovaTec

#### 5.1.1 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A

##### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVA-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 14. Die Antikörperprävalenz stieg von der Altersgruppe 0-2 J. bis zur Altersgruppe 11-12 J. kontinuierlich an, um dann in den Altersgruppen 13-14 J. und 15-17 J. wieder leicht abzufallen. So stieg die Prävalenz von 26,1% in der Altersgruppe 0-2 J., über 58,9% in der Altersgruppe 3-4 J. und 74,2% in der Gruppe der 5- bis 6-jährigen auf genau 80% in der Altersgruppe 7-8 J. und blieb bei den 9- bis 10-jährigen ziemlich konstant (80,7%). Ein Maximum der Antikörperprävalenz wurde in der Altersgruppe 11-12 J. mit 91,5% erreicht. Diese fiel dann wieder leicht ab, von 88,4% bei den 13- bis 14-jährigen auf 81,8% in der Altersgruppe 15-17 Jahre. Die IVA-Antikörperprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 14: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	71	272	26,1	21,0	31,8
3-4	103	175	58,9	51,2	66,2
5-6	112	151	74,2	66,4	80,9
7-8	140	175	80,0	73,3	85,7
9-10	155	192	80,7	74,4	86,1
11-12	184	201	91,5	86,8	95,0
13-14	198	224	88,4	83,5	92,3
15-17	225	275	81,8	76,7	86,2
<b>Gesamt</b>	<b>1188</b>	<b>1665</b>	<b>71,4</b>	<b>69,1</b>	<b>73,5</b>

In Tab. 15 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Studiengruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVA-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 14;  $p = 0.715$ ).



Tab. 15: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	41	151	27,2	20,2	35,0	0-2	30	121	24,8	17,4	33,5
3-4	61	104	58,7	48,6	68,2	3-4	42	71	59,2	46,8	70,7
5-6	56	74	75,7	64,3	84,9	5-6	56	77	72,7	61,4	82,3
7-8	71	89	79,8	69,9	87,6	7-8	69	86	80,2	70,2	88,0
9-10	76	97	78,4	68,8	86,1	9-10	79	95	83,2	74,1	90,1
11-12	90	100	90,0	82,4	95,1	11-12	94	101	93,1	86,2	97,2
13-14	97	112	86,6	78,9	92,3	13-14	101	112	90,2	83,1	95,0
15-17	93	113	82,3	74,0	88,8	15-17	132	162	81,5	74,6	87,1
<b>Gesamt</b>	<b>585</b>	<b>840</b>	<b>69,6</b>	<b>66,4</b>	<b>72,4</b>	<b>Gesamt</b>	<b>603</b>	<b>825</b>	<b>73,1</b>	<b>69,9</b>	<b>76,1</b>

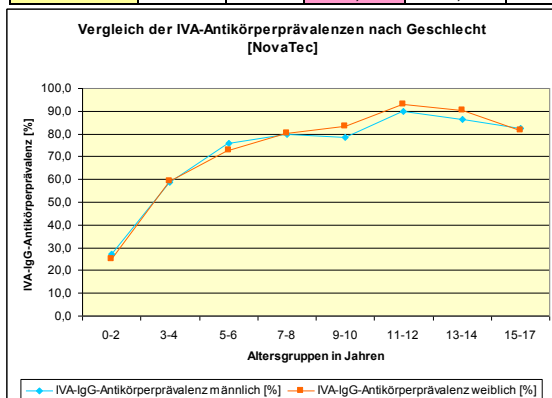


Abb. 14: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (NovaTec).

## Kontrollgruppe

Die IVA-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen in der Kontrollpopulation wurden in der Tab. 16 erfasst. Die Prävalenz sank mit zunehmendem Alter von 69,5% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen über 65,3% in Altersgruppe 30-45 J. auf 62,4% in der Altersgruppe der 46- bis 65-Jährigen. Ein Einfluss des Alters auf die IVA-Seroprävalenz konnte nicht gesichert werden ( $p=0.210$ ).

Tab. 16: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	105	151	69,5	61,5	76,8
30-45	81	124	65,3	56,3	73,6
46-65	78	125	62,4	53,3	70,9
<b>Gesamt</b>	<b>264</b>	<b>400</b>	<b>66,0</b>	<b>61,1</b>	<b>70,6</b>

In Tab. 17 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Die IVA-Antikörperprävalenz war altersadjustiert bei Frauen signifikant höher als bei Männern (Abb. 15;  $p=0.015$ ).

Tab. 17: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	50	79	63,3	51,7	73,1	18-29	55	72	76,4	64,9	85,6
30-45	44	72	61,1	48,9	72,4	30-45	37	52	71,2	56,9	82,9
46-65	46	78	59,0	47,3	70,0	46-65	32	47	68,1	52,9	80,9
Gesamt	140	229	61,1	54,5	67,5	Gesamt	124	171	72,5	65,2	79,1

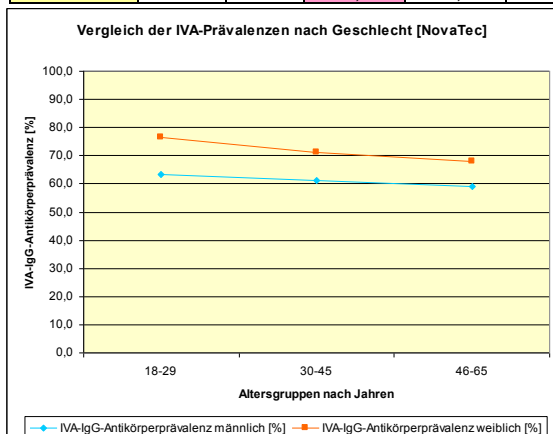


Abb. 15: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (NovaTec).

### Vergleich der IVA-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz für IVA-Antikörper betrug 71,4% [69,1%; 73,5%] für die Studiengruppe und 66% [61,1%; 70,6%] für die Kontrollgruppe. Kinder in der Altersgruppe 0 bis 2 J. hatten eine signifikant niedrigere IVA-Antikörperprävalenz als die Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen. In den Altersgruppen 3-4 J. und 5-6 J. unterschieden sich die IVA-Seroprävalenzen von Kindern und Erwachsenen statistisch nicht. Im Altersbereich 7 bis 17 J. waren die IVA-Prävalenzen in den Altersgruppen der Kinder signifikant höher als bei den Erwachsenen (Abb. 16;  $p < 0.001$ ).

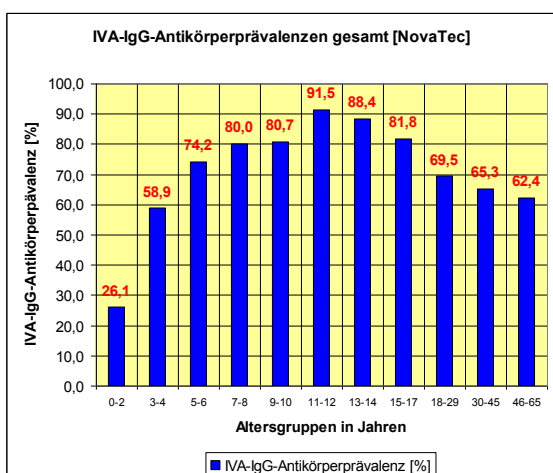


Abb. 16: IVA-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von NovaTec (Studien- und Kontrollgruppe).

### 5.1.2 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A

#### Studiengruppe

In der Population der Kinder und Jugendlichen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 17,85 NTU/ml (SD 13,70 NTU/ml) (Tab. 18) nachgewiesen. Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ). Altersadjustiert gab es keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen ( $p = 0.450$ ).

Tab. 18: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (NovaTec).

IVA-IgG-Konz NovaTec [NTU/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Quartil- abstand
0-2 Jahre	0	272	0,24390	62,47180	9,503735	11,278199	5,495875	9,223490
3-4 Jahre	0	175	1,38417	294,79568	17,742609	23,863444	13,286040	14,503570
5-6 Jahre	0	151	1,15994	59,57804	18,014455	11,450917	15,065870	12,012470
7-8 Jahre	0	175	3,17235	124,78348	19,916913	15,126320	16,341360	9,920550
9-10 Jahre	0	192	3,01117	53,13821	19,610751	10,174398	17,637905	12,675360
11-12 Jahre	0	201	3,52237	71,01716	21,148348	10,470959	19,215290	11,950790
13-14 Jahre	0	224	3,29643	114,31060	20,854528	11,234834	19,095990	12,028685
15-17 Jahre	0	275	3,89355	55,99212	18,704035	9,471575	16,326940	11,138220
Gesamt	0	1665	0,24390	294,79568	17,853886	13,696843	15,596240	13,070870

#### Kontrollgruppe

Für die erwachsenen Kontrollen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 16,92 NTU/ml (SD 12,28 NTU/ml) ermittelt (Tab. 19). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen ( $p = 0.475$ ) und zwischen Männern und Frauen ( $p = 0.346$ ).

Tab. 19: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (NovaTec).

IVA-IgG-Konz NovaTec [NTU/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Quartil- abstand
18-29 Jahre	0	151	3,46521	154,41100	16,759711	14,115527	13,952540	9,405360
30-45 Jahre	0	124	3,71836	65,11869	16,661347	10,066633	13,488215	14,492965
46-65 Jahre	0	125	3,77856	58,87983	17,359466	11,968637	14,258090	14,271570
Gesamt	0	400	3,46521	154,41100	16,916642	12,278185	13,955345	12,051905

#### Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Kinder in der Altersgruppe 0-2 Jahre hatten signifikant niedrigere IVA-Antikörperkonzentration als die erwachsenen Kontrollen ( $p < 0.001$ ). In den

Altersgruppen 3-4 J. ( $p=0.587$ ), 5-6 J. ( $p=0.9978$ ) und 7-8 J. ( $p=0.0519$ ) erreichten die Unterschiede zur Konzentrationshöhe der Kontrollen keine statistische Signifikanz. In den Altersgruppen 9-10 J. ( $p=0.008$ ), 11-12 J. ( $p<0.001$ ), 13-14 J. ( $p<0.001$ ) und 15-17 J. ( $p=0.0127$ ) war die IVA-Antikörperkonzentration signifikant höher als bei den Kontrollen. Eine grafische Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 17.

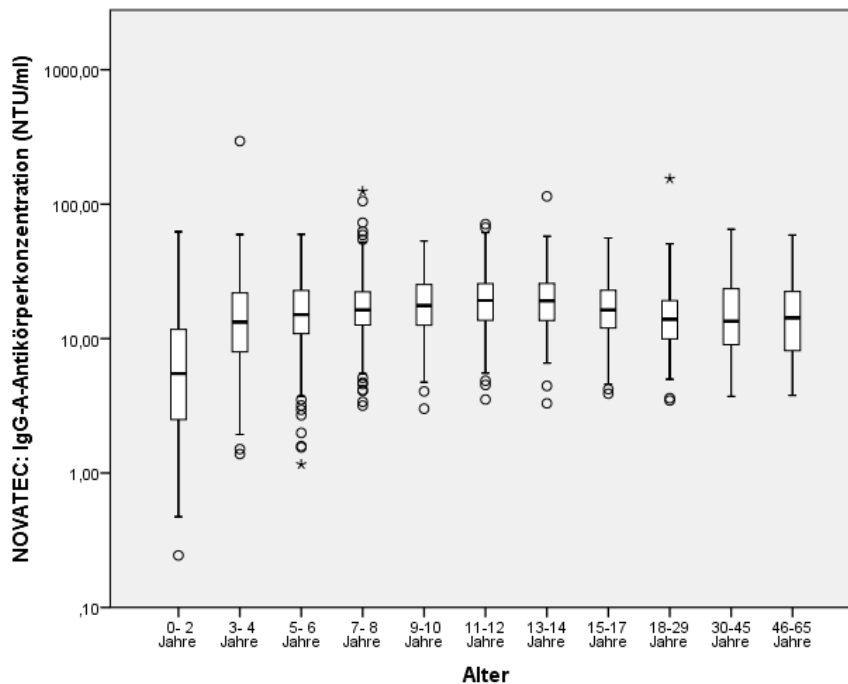


Abb. 17: Altersspezifische Verteilung der IVA-Antikörperkonzentration [NTU/ml] (NOVATEC) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).

### 5.1.3 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B

#### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 20. Die IVB-Antikörperprävalenz war im Gegensatz zur IVA-Antikörperprävalenz deutlich niedriger. Sie erreichte in allen Altersgruppen keine Werte von über 10%. Im Alter von 0 bis 8 J. blieben die Positivbefunde unter 3 %, in der Altersgruppe 9-10 J. stiegen sie dann auf 4,7%. Es folgte eine weitere Steigerung von 3,3% auf 8% in der Altersgruppe 11-12

Jahre. In der Altersgruppe 13-14 J. sank die Prävalenz wieder auf 4,9%, um bei den Jugendlichen von 15 bis 17 J. auf das Maximum von 9,8% innerhalb der Studiengruppe anzusteigen. Die IVB-Seroprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 20: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	6	272	2,2	0,8	4,7
3-4	2	175	1,1	0,1	4,1
5-6	4	151	2,6	0,7	6,6
7-8	4	175	2,3	0,6	5,7
9-10	9	192	4,7	2,2	8,7
11-12	16	201	8,0	4,6	12,6
13-14	11	224	4,9	2,5	8,6
15-17	27	275	9,8	6,6	14,0
<b>Gesamt</b>	<b>79</b>	<b>1665</b>	<b>4,7</b>	<b>3,8</b>	<b>5,9</b>

In Tab. 21 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen der Studiengruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVB-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 18;  $p = 0.388$ ).

Tab. 21: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	4	151	2,6	0,7	6,6	0-2	2	121	1,7	0,2	5,8
3-4	0	104	0,0	0,0	3,5	3-4	2	71	2,8	0,3	9,8
5-6	3	74	4,1	0,8	11,4	5-6	1	77	1,3	0,0	7,0
7-8	1	89	1,1	0,0	6,1	7-8	3	86	3,5	0,7	9,9
9-10	2	97	2,1	0,3	7,3	9-10	7	95	7,4	3,0	14,6
11-12	6	100	6,0	2,2	12,6	11-12	10	101	9,9	4,9	17,5
13-14	8	112	7,1	3,1	13,6	13-14	3	112	2,7	0,6	7,6
15-17	10	113	8,8	4,3	15,7	15-17	17	162	10,5	6,2	16,3
<b>Gesamt</b>	<b>34</b>	<b>840</b>	<b>4,0</b>	<b>2,8</b>	<b>5,6</b>	<b>Gesamt</b>	<b>45</b>	<b>825</b>	<b>5,5</b>	<b>4,0</b>	<b>7,2</b>

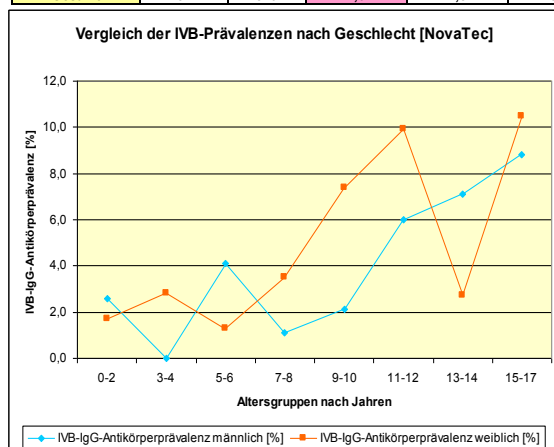


Abb. 18: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (NovaTec).

## Kontrollgruppe

Eine Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Kontrollgruppe zeigt Tab. 22. Die Prävalenz stieg mit zunehmenden Alter von 12,6% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen über 38,7% in Altersgruppe 30-45 J. auf 48% in der Altersgruppe der 46- bis 65-Jährigen. Die IVB-Seroprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 22: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	19	151	12,6	7,7	19,0
30-45	48	124	38,7	30,1	47,9
46-65	60	125	48,0	39,0	57,1
Gesamt	127	400	31,8	27,2	36,6

In Tab. 23 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Altersadjustiert lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen (Abb. 19;  $p = 0.545$ ).

Tab. 23: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (NovaTec).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	12	79	15,2	8,1	25,0	18-29	7	72	9,7	4,0	19,0
30-45	26	72	36,1	25,1	48,3	30-45	22	52	42,3	28,7	56,8
46-65	40	78	51,3	39,7	62,8	46-65	20	47	42,6	28,3	57,8
Gesamt	78	229	34,1	28,0	40,6	Gesamt	49	171	28,7	22,0	36,1

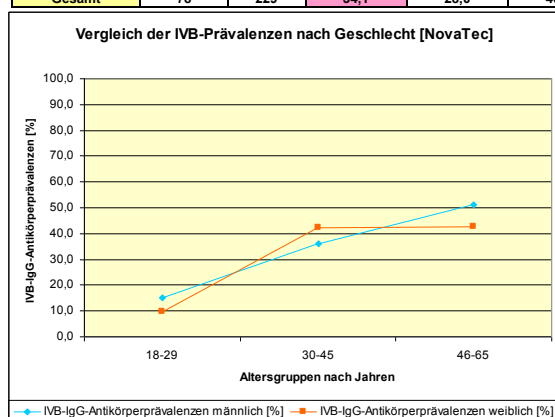


Abb. 19: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (NovaTec).

## Vergleich der IVB-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz der IVB-Antikörper betrug 4,7% [3,8%; 4,9%] für die Studiengruppe und 31,8% [27,2%; 36,6%] für die Kontrollgruppe. Die IVB-

Antikörperprävalenz war bei Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen signifikant niedriger als in der Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollgruppe (Abb. 20;  $p < 0.001$ ).

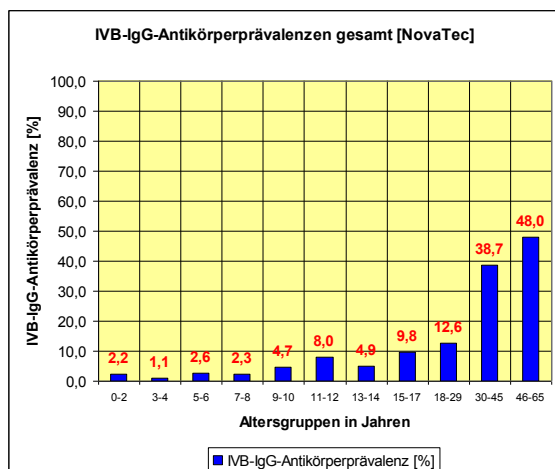


Abb. 20: IVB-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von NovaTec (Studien- und Kontrollgruppe).

#### 5.1.4 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B

##### Studiengruppe

Die mittlere IVB-Antikörperkonzentration betrug bei Kindern und Jugendlichen 3,64 NTU/ml (SD 3,93 NTU/ml) (Tab. 24). Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ). Altersadjustiert gab es keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen ( $p = 0.742$ ).

Tab. 24: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (NovaTec).

IVB-IgG-Konz NovaTec [NTU/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Quartil- Abstand
0-2 Jahre	0	272	0,09352	23,28171	1,547149	2,767441	0,659175	1,097105
3-4 Jahre	0	175	0,11683	16,76610	1,980727	2,351142	1,096960	2,149560
5-6 Jahre	0	151	0,18998	17,21958	2,449140	2,984928	1,440420	2,512180
7-8 Jahre	0	175	0,11449	22,66454	3,151098	3,329037	2,059500	3,174320
9-10 Jahre	0	192	0,25231	29,12104	4,169104	4,198315	2,737715	3,513425
11-12 Jahre	0	201	0,21310	19,56511	4,620019	3,703738	3,577470	4,418440
13-14 Jahre	0	224	0,14664	17,57561	4,606469	3,263190	3,820175	3,959550
15-17 Jahre	0	275	0,34339	40,56748	5,828312	5,119341	4,499790	4,394090
Gesamt	0	1665	0,09352	40,56748	3,635099	3,927664	2,389650	3,998620

## Kontrollgruppe

Für die erwachsenen Kontrollen wurde eine mittlere IVB-Antikörperkonzentration von 8,82 NTU/ml (SD 4,64 NTU/ml) ermittelt (Tab. 25). Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ) und war unabhängig vom Geschlecht ( $p = 0.300$ ).

Tab. 25: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (NovaTec).

IVB-IgG-Konz NovaTec [NTU/ml]	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Statistische Kenngrößen					
			Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Quartil- Abstand
18-29 Jahre	0	151	0,81216	19,31318	6,100565	3,793333	5,262610	4,639430
30-45 Jahre	0	124	1,87324	26,26899	10,057523	4,391201	9,588770	5,994695
46-65 Jahre	0	125	1,54732	23,32137	10,874911	4,247050	10,755900	5,605490
Gesamt	0	400	0,81216	26,26899	8,819205	4,642951	8,383570	6,936555

## Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die IVB-Antikörperkonzentration war für Kinder und Jugendliche aller Altersgruppen signifikant niedriger als die Konzentration in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Eine grafische Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 21.

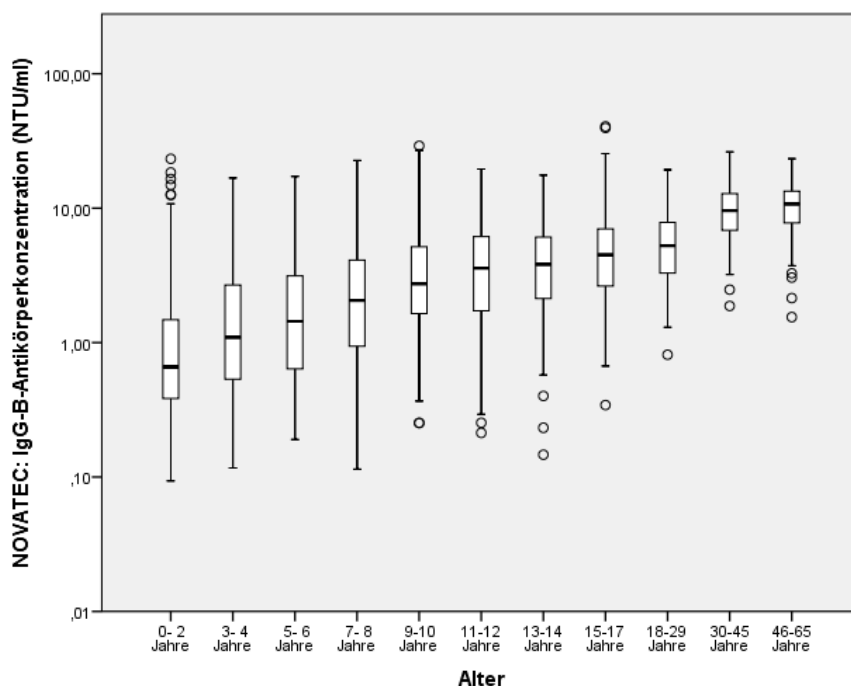


Abb. 21: Altersspezifische Verteilung der IVB-Antikörperkonzentration [NTU/ml] (NOVATEC) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).



## 5.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von Euroimmun

### 5.2.1 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A

#### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVA-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 26. Die Antikörperprävalenz stieg von der Altersgruppe 0-2 J. (8,1%) bis zur Altersgruppe 11-12 J. (75,6%) kontinuierlich an und blieb bei den 13- bis 14-Jährigen auf diesem Niveau konstant (75,4%). Ein weiterer Anstieg der Prävalenz auf ein Maximum von 84% wurde in der Altersgruppe 15-17 J. erreicht. Die IVA-Antikörperprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 26: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	22	272	8,1	5,1	12,0
3-4	31	175	17,7	12,4	24,2
5-6	57	151	37,7	30,0	46,0
7-8	105	175	60,0	52,3	67,3
9-10	124	192	64,6	57,4	71,3
11-12	152	201	75,6	69,1	81,4
13-14	169	224	75,4	69,3	80,9
15-17	231	275	84,0	79,1	88,1
Gesamt	891	1665	53,5	51,1	55,9

In Tab. 27 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Jungen und Mädchen der Studiengruppe getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVA-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 22;  $p = 0.316$ ).

Tab. 27: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	14	151	9,3	5,2	15,1	0-2	8	121	6,6	2,9	12,6
3-4	19	104	18,3	11,4	27,1	3-4	12	71	16,9	9,0	27,7
5-6	26	74	35,1	24,4	47,1	5-6	31	77	40,3	29,2	52,1
7-8	55	89	61,8	50,9	71,9	7-8	50	86	58,1	47,0	68,7
9-10	58	97	59,8	49,3	69,6	9-10	66	95	69,5	59,2	78,5
11-12	74	100	74,0	64,3	82,3	11-12	78	101	77,2	67,8	85,0
13-14	87	112	77,7	68,8	85,0	13-14	82	112	73,2	64,0	81,1
15-17	88	113	77,9	69,1	85,1	15-17	143	162	88,3	82,3	92,8
Gesamt	421	840	50,1	46,7	53,5	Gesamt	470	825	57,0	53,5	60,4

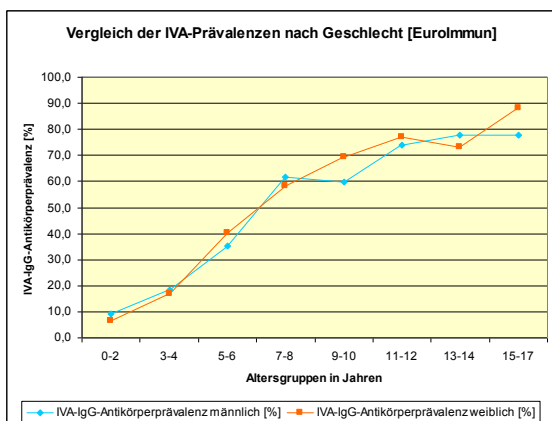


Abb. 22: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Euroimmun).

### Kontrollgruppe

Eine Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Kontrollgruppe zeigt Tab. 28. Die Prävalenz stieg mit zunehmenden Alter von 95,4% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen über 96,8% in Altersgruppe 30-45 J. auf 97,6% bei den 46- bis 65-Jährigen Probanden. Ein Einfluss des Alters auf die IVA-Seroprevalenz konnte nicht gesichert werden ( $p=0.310$ ).

Tab. 28: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	144	151	95,4	90,7	98,1
30-45	120	124	96,8	91,9	99,1
46-65	122	125	97,6	93,1	99,5
<b>Gesamt</b>	<b>386</b>	<b>400</b>	<b>96,5</b>	<b>94,2</b>	<b>98,1</b>

In Tab. 29 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Altersadjustiert lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Männer und Frauen feststellen (Abb. 23;  $p=0.547$ ).

Tab. 29: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	76	79	96,2	89,3	99,2	18-29	68	72	94,4	86,4	98,5
30-45	68	72	94,4	86,4	98,5	30-45	52	52	100,0	93,2	100,0
46-65	76	78	97,4	91,0	99,7	46-65	46	47	97,9	88,7	99,9
<b>Gesamt</b>	<b>220</b>	<b>229</b>	<b>96,1</b>	<b>92,7</b>	<b>98,2</b>	<b>Gesamt</b>	<b>166</b>	<b>171</b>	<b>97,1</b>	<b>93,3</b>	<b>99,0</b>

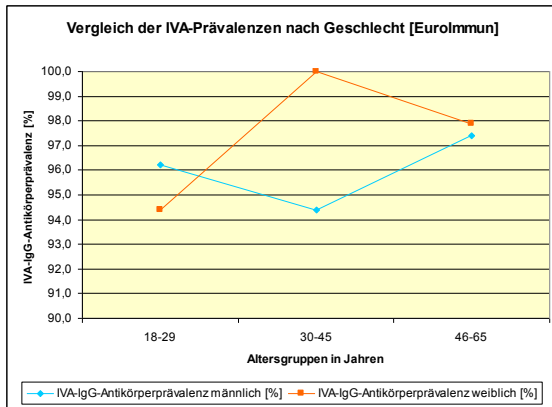


Abb. 23: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Euroimmun).

### Vergleich der IVA-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz der IVA-Antikörper betrug 53,5% [51,1%; 55,9%] für die Studiengruppe und 96,5% [94,2%; 98,1%] für die Kontrollgruppe. Kinder und Jugendliche hatten in allen acht Altersgruppen eine signifikant niedrigere IVA-Antikörperprävalenz als die Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen (Abb. 24;  $p < 0.001$ ).

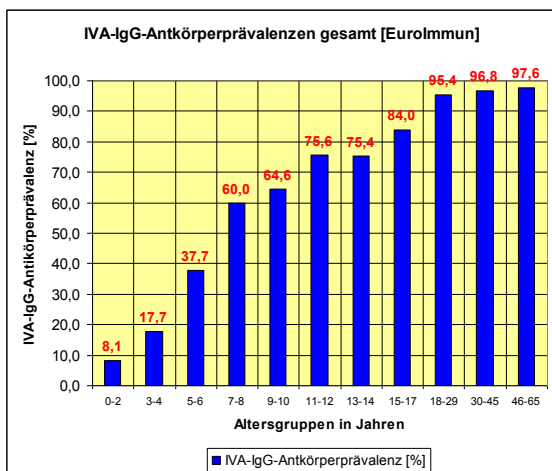


Abb. 24: IVA-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von Euroimmun (Studien- und Kontrollgruppe).

## 5.2.2 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A

### Studiengruppe

In der Population der Kinder und Jugendlichen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 50,12 RE/ml (SD 41,55 RE/ml) (Tab. 30) nachgewiesen. 272 Serumproben blieben unter der Nachweisgrenze ( $< \text{Min}$ ) und eine Probe wurde über der Nachweisgrenze des Tests ( $> \text{Max}$ ) gemessen. Sie konnten deshalb nicht in

die Konzentrationsberechnungen mit einfließen (16,4%). Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ). Altersadjustiert gab es keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen ( $p = 0.466$ ).

Tab. 30: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (Euroimmun).

IVA-IgG-Konz Euroimmun [RE/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Quartil- Abstand
0-2 Jahre	179	93	2,00	144,96	21,791	31,423	9,020	15,460
3-4 Jahre	58	117	2,03	118,80	20,783	23,375	12,580	16,910
5-6 Jahre	19	132	2,40	150,40	29,499	30,941	15,355	32,775
7-8 Jahre	10	165	2,53	153,23	40,905	31,643	35,600	41,340
9-10 Jahre	0	192	2,35	197,39	48,496	39,070	42,115	50,610
11-12 Jahre	3	198	3,33	166,11	57,814	37,600	52,485	57,420
13-14 Jahre	3	221	3,14	177,16	62,336	41,066	57,250	63,880
15-17 Jahre	1	274	3,36	197,07	73,481	45,945	68,270	64,320
Gesamt	273	1392	2,00	197,39	50,122	41,550	40,745	60,025

### Kontrollgruppe

Für die erwachsenen Kontrollen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 94,72 RE/ml (SD 43,36 RE/ml) ermittelt (Tab. 31). Elf Serumproben (2,8%) wiesen Konzentrationen über der Nachweisgrenze ( $> \text{Max}$ ) auf und konnten deshalb nicht in die Berechnungen mit einfließen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen ( $p = 0.739$ ) und zwischen Männern und Frauen ( $p = 0.761$ ).

Tab. 31: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (Euroimmun).

IVA-IgG-Konz Euroimmun [RE/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- Abweichung	Median	Quartil- abstand
18-29 Jahre	5	146	6,89	199,31	97,745	47,269	96,010	76,620
30-45 Jahre	5	119	9,95	184,70	94,164	41,751	87,960	57,700
46-65 Jahre	1	124	9,78	197,70	91,690	40,040	87,895	49,135
Gesamt	11	389	6,89	199,31	94,719	43,357	91,090	63,540

### Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die IVA-Antikörperkonzentration war für Kinder und Jugendliche aller Altersgruppen signifikant niedriger als die Konzentration in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Eine grafische Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 25.

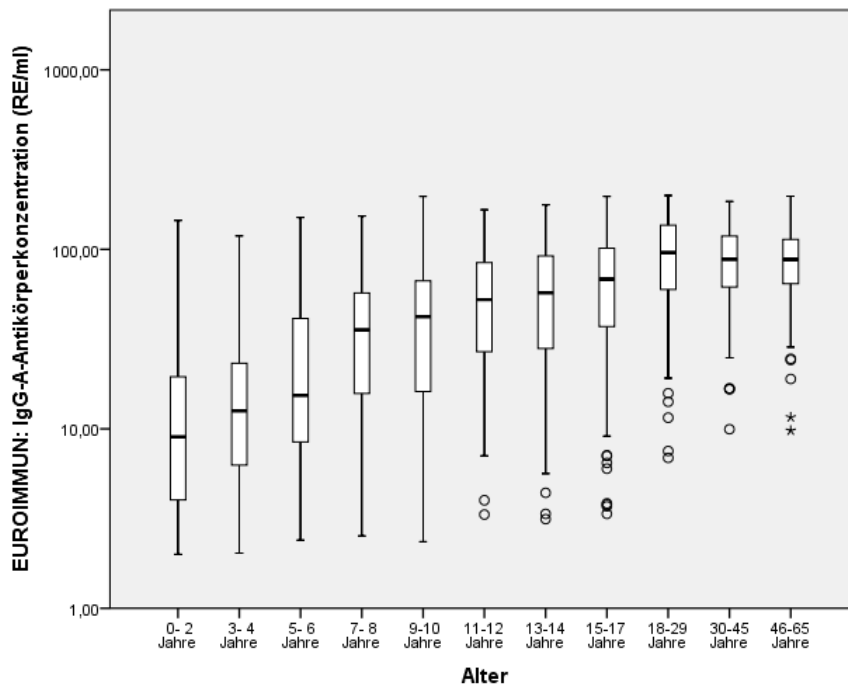


Abb. 25: Altersspezifische Verteilung der IVA-Antikörperkonzentration [RE/ml] (Euroimmun) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).

### 5.2.3 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B

#### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVB-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 32. Die Antikörperprävalenz stieg mit steigendem Alter stetig an. Betrug die Prävalenz in der Altersgruppe 0-2 J. nur 8,8%, so erreichte sie ab den 9- bis 10-Jährigen Probanden schon Werte über 50%. Das Maximum lag mit 85,5% in der Altersgruppe 15-17 Jahre. Die IVB-Antikörperprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 32: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	24	272	8,8	5,7	12,8
3-4	24	175	13,7	9,0	19,7
5-6	34	151	22,5	16,1	30,0
7-8	65	175	37,1	30,0	44,8
9-10	106	192	55,2	47,9	62,4
11-12	129	201	64,2	57,1	70,8
13-14	166	224	74,1	67,9	79,7
15-17	235	275	85,5	80,7	89,4
<b>Gesamt</b>	<b>783</b>	<b>1665</b>	<b>47,0</b>	<b>44,6</b>	<b>49,5</b>

In Tab. 33 sind die Ergebnisse Prävalenzbestimmungen für die Jungen und Mädchen der Studiengruppe getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVB-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 26;  $p=0.977$ ).

Tab. 33: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	18	151	11,9	7,2	18,2	0-2	6	121	5,0	1,8	10,5
3-4	13	104	12,5	6,8	20,4	3-4	11	71	15,5	8,0	26,0
5-6	19	74	25,7	16,2	37,2	5-6	15	77	19,5	11,3	30,1
7-8	35	89	39,3	29,1	50,3	7-8	30	86	34,9	24,9	45,9
9-10	50	97	51,5	41,2	61,8	9-10	56	95	58,9	48,4	68,9
11-12	62	100	62,0	51,8	71,5	11-12	67	101	66,3	56,3	75,4
13-14	77	112	68,8	59,3	77,2	13-14	89	112	79,5	70,8	86,5
15-17	100	113	88,5	81,1	93,7	15-17	135	162	83,3	76,7	88,7
<b>Gesamt</b>	<b>374</b>	<b>840</b>	<b>44,5</b>	<b>41,1</b>	<b>48,0</b>	<b>Gesamt</b>	<b>409</b>	<b>825</b>	<b>49,6</b>	<b>46,1</b>	<b>53,0</b>

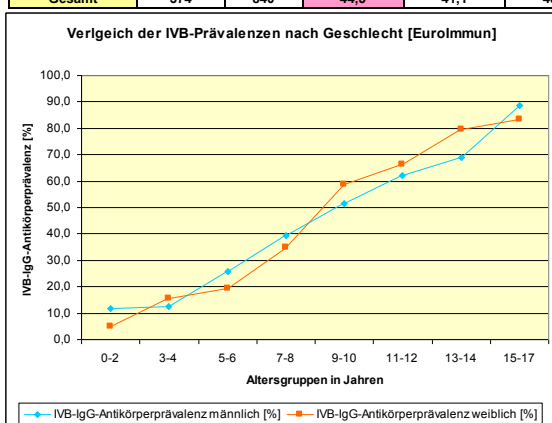


Abb. 26: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Euroimmun).

## Kontrollgruppe

Eine Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Kontrollgruppe zeigt Tab. 34. Die Prävalenz nahm mit steigendem Alter von 96% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen über 98,4%

in Altersgruppe 30-45 J. auf 100% in der Altersgruppe der 46- bis 65-Jährigen stetig zu. Die IVB-Seroprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p=0.018$ ).

Tab. 34: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	145	151	96,0	91,6	98,5
30-45	122	124	98,4	94,3	99,8
46-65	125	125	100,0	97,1	100,0
Gesamt	392	400	98,0	96,1	99,1

In Tab. 35 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Altersadjustiert ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen (Abb. 27;  $p=0.635$ ).

Tab. 35: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (Euroimmun).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	75	79	94,9	87,5	98,6	18-29	70	72	97,2	90,3	99,7
30-45	71	72	98,6	92,5	100,0	30-45	51	52	98,1	89,7	100,0
46-65	78	78	100,0	95,4	100,0	46-65	47	47	100,0	92,5	100,0
Gesamt	224	229	97,8	95,0	99,3	Gesamt	168	171	98,2	95,0	99,6

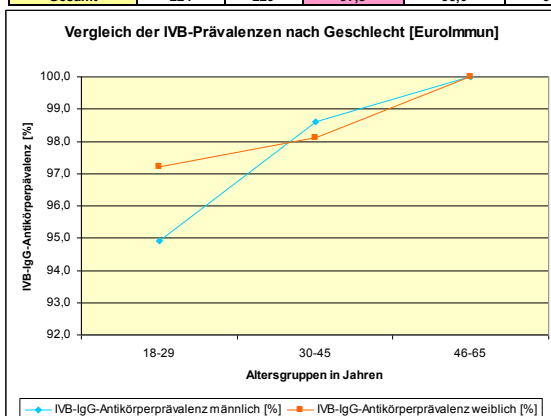


Abb. 27: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (Euroimmun).

### Vergleich der IVB-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz der IVB-Antikörper betrug 47% [44,6%; 49,5%] für die Studiengruppe und 98% [96,1%; 99,1%] für die Kontrollgruppe. Die IVB-Antikörperprävalenz war bei Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen signifikant niedriger als in der Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollgruppe (Abb. 28;  $p<0.001$ ).

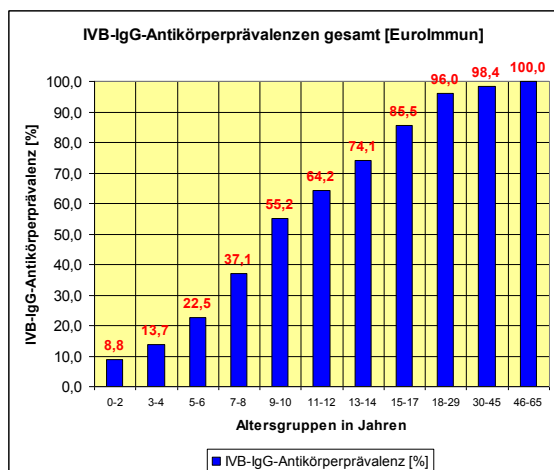


Abb. 28: IVB-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von Euroimmun (Studien- und Kontrollgruppe).

## 5.2.4 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B

### Studiengruppe

Die mittlere IVB-Antikörperkonzentration betrug bei Kindern und Jugendlichen 54,67 RE/ml (SD 55,30 NTU/ml) (Tab. 36). Bei einem Teil der Probanden lagen die Konzentrationen außerhalb der Nachweisgrenzen des Tests (13,4%). 208 Proben lagen unter dem Minimum und 15 Proben über dem Maximum. Sie konnten somit nicht in die Berechnungen mit einfließen. Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ). Altersadjustiert gab es keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen ( $p = 0.317$ ).

Tab. 36: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (Euroimmun).

IVB-IgG-Konz Euroimmun [RE/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Quartil- abstand
0-2 Jahre	93	179	2,01	155,46	15,180	31,062	3,730	5,220
3-4 Jahre	44	131	2,04	189,47	19,860	35,715	5,680	14,120
5-6 Jahre	30	121	2,00	194,19	29,947	44,214	10,060	28,860
7-8 Jahre	24	151	2,16	177,85	38,025	43,352	15,060	53,180
9-10 Jahre	13	179	2,11	199,39	56,408	53,692	31,860	86,320
11-12 Jahre	8	193	2,76	197,66	66,468	53,763	65,410	92,690
13-14 Jahre	3	221	2,16	196,67	77,015	55,657	76,270	96,460
15-17 Jahre	8	267	3,42	195,18	90,632	53,694	91,500	93,090
Gesamt	223	1442	2,00	199,39	54,666	55,304	29,245	89,440



### Kontrollgruppe

Für erwachsene Kontrollen wurde eine mittlere IVB-Antikörperkonzentration von 119,31 RE/ml (SD 44,97 RE/ml) ermittelt (Tab. 37). Bei den 400 Erwachsenen lagen 30 Proben (7,5%) über der Nachweisgrenze ( $>Max$ ). Sie konnten somit nicht in die Berechnungen mit einfließen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen ( $p=0.228$ ) und zwischen Männern und Frauen ( $p=0.892$ ).

Tab. 37: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (Euroimmun).

IVB-IgG-Konz Euroimmun [RE/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Quartil- abstand
18-29 Jahre	7	144	11,52	199,49	106,095	46,626	104,665	69,815
30-45 Jahre	11	113	14,53	198,92	127,222	41,766	129,660	60,800
46-65 Jahre	12	113	25,72	197,88	128,245	42,122	126,410	57,450
Gesamt	30	370	11,52	199,49	119,312	44,970	121,630	66,700

### Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die IVB-Antikörperkonzentration war für Kinder und Jugendliche aller Altersgruppen signifikant niedriger als die Konzentration in der Kontrollgruppe ( $p<0.001$ ). Eine grafische Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 29.

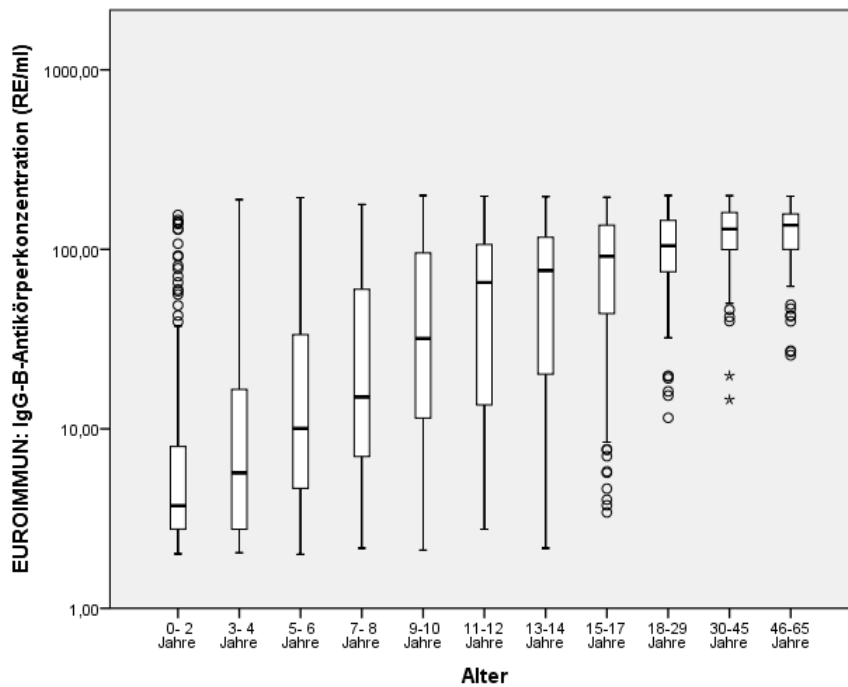


Abb. 29: Altersspezifische Verteilung der IVB-Antikörperkonzentration [RE/ml] (Euroimmun) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).

### 5.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay von IBL

#### 5.3.1 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus A

##### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVA-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 38. Die Antikörperprävalenz stieg von der Altersgruppe 0-2 J. (46,5%) bis zur Altersgruppe 11-12 J. kontinuierlich bis auf 100% an, um dann bei den 13- bis 14-Jährigen (99,6%) und 15- bis 17-Jährigen (100%) auf dem Niveau konstant zu bleiben. Eine Probe konnte nicht ausgewertet werden, da kein Serum mehr vorhanden war. Die IVA-Antikörperprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 38: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	126	271	46,5	40,4	52,6
3-4	140	175	80,0	73,3	85,7
5-6	135	151	89,4	83,4	93,8
7-8	168	175	96,0	91,9	98,4
9-10	190	192	99,0	96,3	99,9
11-12	201	201	100,0	98,2	100,0
13-14	223	224	99,6	97,5	100,0
15-17	275	275	100,0	98,7	100,0
Gesamt	1458	1664	87,6	85,9	89,2

In Tab. 39 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Studiengruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVA-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 30;  $p=0.576$ ).

Tab. 39: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	71	150	47,3	39,1	55,6	0-2	55	121	45,4	36,4	54,8
3-4	81	104	77,9	68,7	85,4	3-4	59	71	83,1	72,3	91,0
5-6	64	74	86,5	76,6	93,3	5-6	71	77	92,2	83,8	97,1
7-8	86	89	96,6	90,5	99,3	7-8	82	86	95,3	88,5	98,7
9-10	95	97	97,9	92,8	99,8	9-10	95	95	100,0	96,2	100,0
11-12	100	100	100,0	96,4	100,0	11-12	101	101	100,0	96,4	100,0
13-14	112	112	100,0	96,8	100,0	13-14	111	112	99,1	95,1	100,0
15-17	113	113	100,0	96,8	100,0	15-17	162	162	100,0	97,8	100,0
Gesamt	722	839	86,1	83,5	88,3	Gesamt	736	825	89,2	86,9	91,2

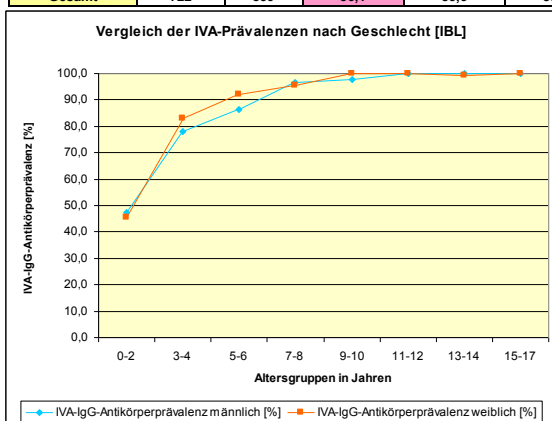


Abb. 30: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (IBL).

## Kontrollgruppe

Eine Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Kontrollgruppe zeigt Tab. 40. Die Prävalenz sank mit zunehmendem Alter von 99,3% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen über

96,0% in Altersgruppe 30-45 J. auf 92,8% bei den 46- bis 65-Jährigen Probanden. Die IVA-Seroprävalenz nahm signifikant mit dem Alter ( $p=0.004$ ) ab.

Tab. 40: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	150	151	99,3	96,4	100,0
30-45	119	124	96,0	90,8	98,7
46-65	116	125	92,8	86,8	96,7
Gesamt	385	400	96,3	93,9	97,9

In Tab. 41 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Die IVA-Antikörperprävalenz war altersadjustiert bei Frauen signifikant höher als bei Männern (Abb. 31;  $p=0.031$ ).

Tab. 41: Übersicht der IVA-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	78	79	98,7	93,2	100,0	18-29	72	72	100,0	95,0	100,0
30-45	67	72	93,1	84,5	97,7	30-45	52	52	100,0	93,2	100,0
46-65	71	78	91,0	82,4	96,3	46-65	45	47	95,7	85,5	99,5
Gesamt	216	229	94,3	90,5	96,9	Gesamt	169	171	98,8	95,8	99,9

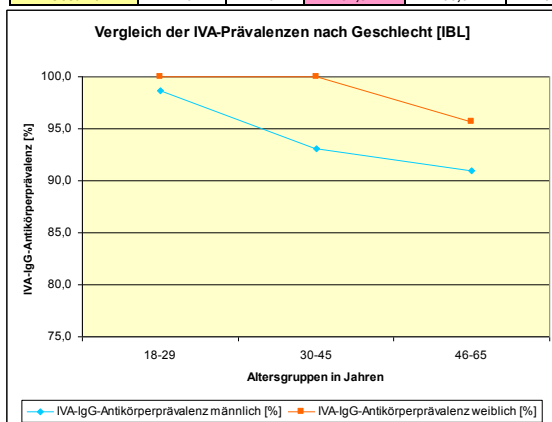


Abb. 31: Verlauf der IVA-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (IBL).

### Vergleich der IVA-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz der IVA-Antikörper betrug 87,6% [85,9%; 89,2%] für die Studiengruppe und 96,3% [93,9%; 97,9%] für die Kontrollgruppe. Kinder in den Altersgruppen 0 bis 2 J. ( $p<0.001$ ), 3 bis 4 J. ( $p<0.001$ ) und 5 bis 6 J. ( $p=0.003$ ) hatten eine signifikant niedrigere IVA-Antikörperprävalenz als die Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen. Im Altersbereich 7 bis 12 J. und 15 bis 17 J. unterschieden sich die IVA-Prävalenzen von Kindern und Erwachsenen statistisch nicht wesentlich ( $p>0.05$ ). In der Altersgruppe 13 bis 14 Jahre waren die IVA-Prävalenzen in den

Altersgruppen der Kinder signifikant höher als bei den Erwachsenen (Abb. 32;  $p=0.037$ ).

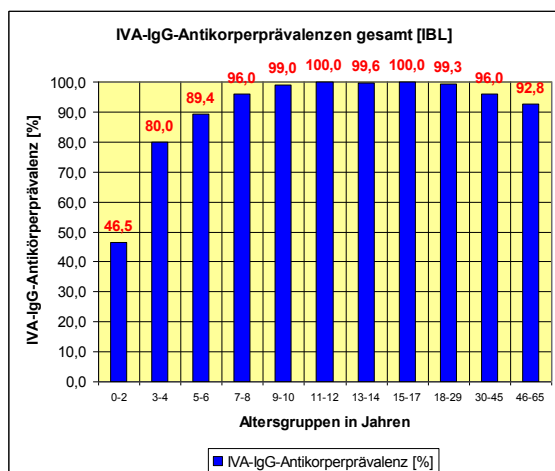


Abb. 32: IVA-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von IBL (Studien- und Kontrollgruppe).

### 5.3.2 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus A

#### Studiengruppe

In der Population der Kinder und Jugendlichen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 59,95 U/ml (SD 46,04 U/ml) (Tab. 42) nachgewiesen. 656 Serumproben (39,4%) blieben über der Nachweisgrenze des Tests ( $>Max$ ). Sie konnten deshalb nicht in die Konzentrationsberechnungen mit einfließen. Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p<0.001$ ). Altersadjustiert gab es keine Unterschiede zwischen Jungen und Mädchen ( $p=0.426$ ).

Tab. 42: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (IBL).

IVA-IgG-Konz IBL [U/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Interquartil- bereich
0-2 Jahre	14	257	1,29310	140,90000	21,119262	29,137813	9,900900	19,305700
3-4 Jahre	12	163	2,06960	148,50000	42,302173	35,058770	33,875000	46,155000
5-6 Jahre	24	127	2,09380	141,03000	48,785393	33,939591	44,107000	53,251000
7-8 Jahre	50	125	2,48010	148,82000	69,661154	38,926078	64,059000	59,065500
9-10 Jahre	90	102	7,82420	149,73000	88,443459	40,059969	90,656000	62,288300
11-12 Jahre	115	86	22,69700	149,78000	102,301140	29,062609	104,040000	46,582000
13-14 Jahre	163	61	3,37600	149,48000	105,642016	34,353419	114,830000	49,747000
15-17 Jahre	188	87	18,36200	149,38000	102,718526	32,576320	105,540000	53,827000
Gesamt	656	1664	1,29310	149,78000	59,946014	46,043555	54,526500	84,088500

### Kontrollgruppe

Für erwachsene Kontrollen wurde eine mittlere IVA-Antikörperkonzentration von 72,02 U/ml (SD 39,90 U/ml) ermittelt (Tab. 43). 185 Serumproben (46,2%) wiesen Konzentrationen über der Nachweisgrenze auf. Sie konnten deshalb nicht in die Berechnungen mit einfließen. Die Konzentration sank signifikant mit dem Alter ( $p=0.041$ ) und war unabhängig von Geschlecht ( $p=0.300$ ).

Tab. 43: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVA-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (IBL).

IVA-IgG-Konz IBL [U/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Interquartil- bereich
18-29 Jahre	99	52	11,76900	148,48000	85,748808	40,329822	81,582000	61,883500
30-45 Jahre	46	78	7,84990	145,05000	69,354973	39,263050	70,719000	68,935300
46-65 Jahre	40	85	6,93320	147,34000	66,056347	38,673003	62,641000	58,167000
Gesamt	185	215	6,93320	148,48000	72,015886	39,898347	70,505000	66,379000

### Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Kinder im Alter von 0 bis 6 Jahren hatten eine signifikant niedrigere IVA-Antikörperkonzentration als die erwachsenen Kontrollen ( $p<0.001$ ). Während in den Altersgruppen 7-8 J. ( $p=1.000$ ) und 9-10 J. ( $p=0.068$ ) die Unterschiede zur Konzentrationshöhe der Kontrollen keine statistische Signifikanz erreichten, waren diese in den Altersgruppen 11-12 J. ( $p<0.001$ ), 13-14 J. ( $p=0.001$ ) und 15-17 J. ( $p<0.001$ ) signifikant höher als bei den Kontrollen. Eine grafische Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 33.

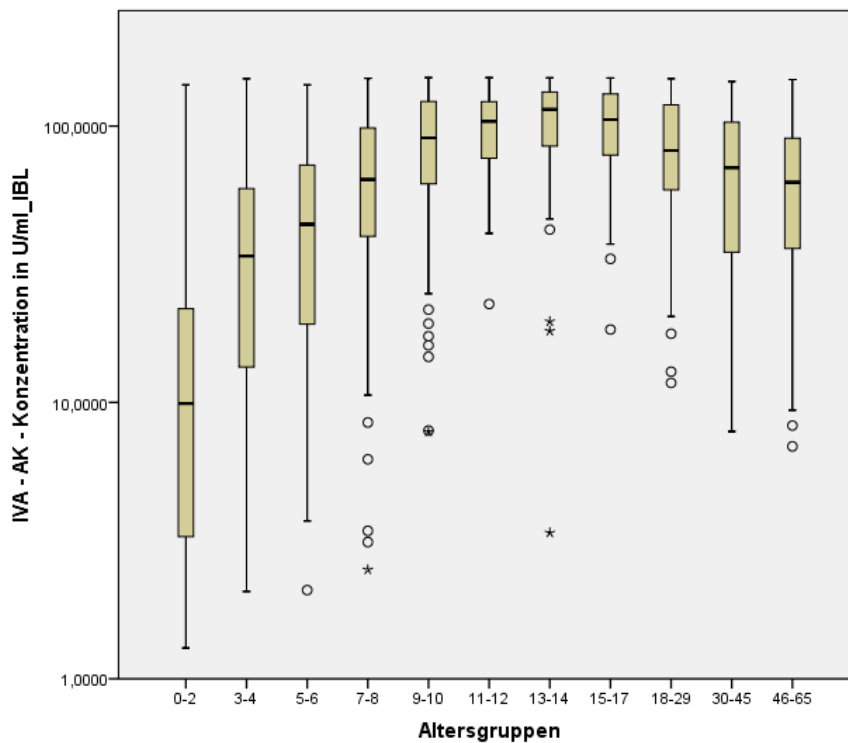


Abb. 33: Altersspezifische Verteilung der IVA-Antikörperkonzentration [U/ml] (IBL) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).

### 5.3.3 Antikörperprävalenzen gegen Influenzavirus B

#### Studiengruppe

Eine Übersicht der IVB-Seroprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Studiengruppe zeigt Tab. 44. Die Antikörperprävalenz stieg mit zunehmendem Alter stetig an. Betrug die Prävalenz in der Altersgruppe 0-2 J. nur 4,8%, so erreichte sie ab den 9- bis 10-Jährigen Probanden Werte über 20% und erreichte ihr Maximum in der Altersgruppe 15-17 J. (60,7%). Eine Probe konnte nicht ausgewertet werden, da kein Serum mehr vorhanden war. Die IVB-Antikörperprävalenz stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ).

Tab. 44: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Studiengruppe (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	13	271	4,8	2,6	8,1
3-4	12	175	6,9	3,6	11,7
5-6	21	151	13,9	8,8	20,5
7-8	37	175	21,1	15,3	27,9
9-10	71	192	37,0	30,1	44,2
11-12	89	201	44,3	37,3	51,4
13-14	121	224	54,0	47,3	60,7
15-17	167	275	60,7	54,7	66,5
<b>Gesamt</b>	<b>531</b>	<b>1664</b>	<b>31,9</b>	<b>29,7</b>	<b>34,2</b>

In Tab. 45 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Studiengruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Unter Berücksichtigung der Altersgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede der IVB-Antikörperprävalenz zwischen Jungen und Mädchen festgestellt werden (Abb. 34;  $p=0.249$ ).

Tab. 45: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
0-2	10	150	6,7	3,2	11,9	0-2	3	121	2,5	0,5	7,1
3-4	5	104	4,8	1,6	10,9	3-4	7	71	9,9	4,1	19,3
5-6	12	74	16,2	8,7	26,6	5-6	9	77	11,7	5,5	21,0
7-8	19	89	21,3	13,4	31,3	7-8	16	86	20,9	12,9	31,0
9-10	36	97	37,1	27,5	47,5	9-10	35	95	36,8	27,2	47,4
11-12	41	100	41,0	31,3	51,3	11-12	48	101	47,5	37,5	57,7
13-14	53	112	47,3	37,8	57,0	13-14	68	112	60,7	51,0	69,8
15-17	67	113	59,3	49,7	68,4	15-17	100	162	61,7	53,8	69,2
<b>Gesamt</b>	<b>243</b>	<b>839</b>	<b>29,0</b>	<b>25,9</b>	<b>32,2</b>	<b>Gesamt</b>	<b>288</b>	<b>825</b>	<b>34,9</b>	<b>31,7</b>	<b>38,3</b>

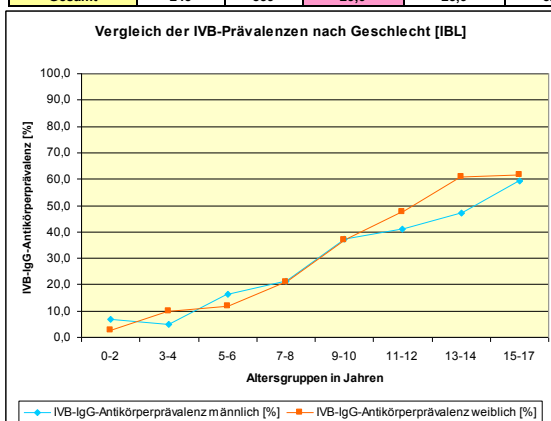


Abb. 34: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (IBL).

## Kontrollgruppe

Eine Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen mit den zugehörigen zweiseitigen 95% Konfidenzintervallen der gesamten Kontrollgruppe zeigt Tab. 46. Die Prävalenz stieg mit zunehmendem Alter von 75,5% in der Altersgruppe der 18- bis 29-Jährigen auf



93,5% und 93,6% in den beiden Altersgruppen 30-45 J. und 46-65 Jahre. Die IVB-Seroprävalenz nahm signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ) zu.

Tab. 46: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der Kontrollgruppe (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anzahl der Probanden	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	114	151	75,5	67,8	82,1
30-45	116	124	93,5	87,7	97,2
46-65	117	125	93,6	87,8	97,2
Gesamt	347	400	86,8	83,0	89,9

In Tab. 47 sind die Ergebnisse der Prävalenzbestimmungen für die Kontrollgruppe geschlechtlich getrennt aufgeführt. Altersadjustiert ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen feststellen (Abb. 35;  $p = 0.759$ ).

Tab. 47: Übersicht der IVB-Antikörperprävalenzen der männlichen (linke Tabellenseite) und weiblichen (rechte Tabellenseite) Probanden (IBL).

Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Positive Befunde	Anz. d. Prob.	Prävalenz (Prozent)	95% CIU (Prozent)	95% CIO (Prozent)
18-29	61	79	77,2	66,4	85,9	18-29	53	72	73,6	61,9	83,3
30-45	67	72	93,1	84,5	97,7	30-45	49	52	94,2	84,1	98,8
46-65	73	78	93,6	85,7	97,9	46-65	44	47	93,6	82,5	98,7
Gesamt	201	229	87,8	82,8	91,7	Gesamt	146	171	85,4	79,2	90,3

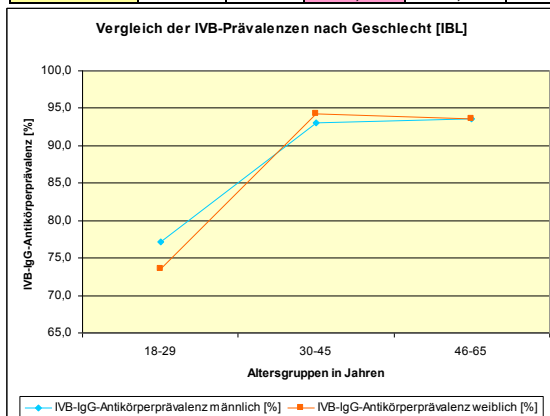


Abb. 35: Verlauf der IVB-Antikörperprävalenzen in Abhängigkeit vom Geschlecht (IBL).

### Vergleich der IVB-Antikörperprävalenzen Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die Gesamtprävalenz der IVB-Antikörper betrug 31,9% [29,7%; 34,2%] für die Studiengruppe und 86,8% [83,0%; 89,9%] für die Kontrollgruppe. Die IVB-Antikörperprävalenz war bei Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen signifikant niedriger als in der Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen (Abb. 36;  $p < 0.001$ ).

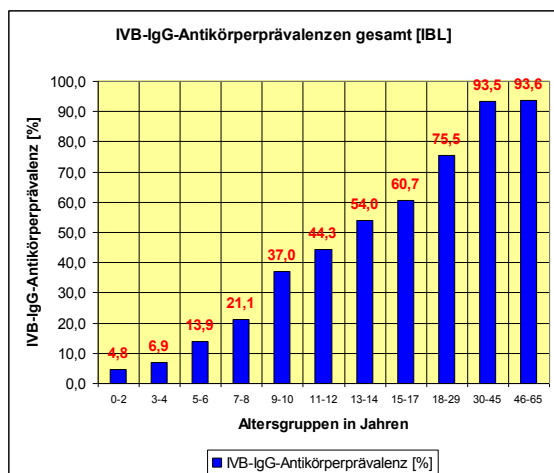


Abb. 36: IVB-Antikörperprävalenz aller Altersgruppen von IBL (Studien- und Kontrollgruppe).

### 5.3.4 Semiquantitative Antikörperbefunde gegen Influenzavirus B

#### Studiengruppe

Die mittlere IVB-Antikörperkonzentration betrug bei Kindern und Jugendlichen 12,24 U/ml (SD 17,65 U/ml) (Tab. 48). Von insgesamt 1.664 Seren lagen 8 Proben (0,5%) über dem Maximum. Sie konnten somit nicht in die Berechnungen mit einfließen. Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ) und war unabhängig vom Geschlecht ( $p = 0.311$ ).

Tab. 48: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Studiengruppe unterteilt nach Altersgruppen (IBL).

IVB-IgG-Konz IBL [U/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standardabweichung	Median	Interquartilbereich
0-2 Jahre	0	271	1,04260	85,43000	3,434917	9,472083	1,306100	0,474600
3-4 Jahre	0	175	1,10080	52,67300	4,114833	7,886997	1,520400	1,523000
5-6 Jahre	0	151	1,08910	86,21800	6,250891	11,387318	1,999100	3,828100
7-8 Jahre	0	175	1,03180	85,98500	8,400675	12,254613	3,099000	8,237300
9-10 Jahre	3	189	1,09760	154,34000	13,841937	19,393182	6,146300	14,793700
11-12 Jahre	0	201	1,10850	138,66000	16,460615	19,588122	10,277000	18,066800
13-14 Jahre	0	224	1,12390	79,69600	18,374180	17,971635	13,286500	19,012600
15-17 Jahre	5	270	1,27760	138,17000	22,851100	22,158162	14,898500	23,880300
Gesamt	8	1558	1,03180	154,34000	12,243529	17,650996	4,078200	14,088200

#### Kontrollgruppe

Die mittlere IVB-Antikörperkonzentration betrug bei den Erwachsenen 43,24 U/ml (SD 31,54 U/ml) (Tab. 49). Bei den 400 Erwachsenen lagen 3 Proben (0,75%) über dem

Maximum. Sie konnten somit nicht in die Berechnungen mit einfließen. Die Konzentration stieg signifikant mit dem Alter ( $p=0.036$ ) und war unabhängig vom Geschlecht ( $p=0.847$ ).

Tab. 49: Übersicht statistischer Kenngrößen der IVB-IgG-Antikörperkonzentrationen der Kontrollgruppe unterteilt nach Altersgruppen (IBL).

IVB-IgG-Konz IBL [U/ml]	Statistische Kenngrößen							
	Fehlende Werte	Anzahl Probanden	Min	Max	arithmet. Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Interquartil- bereich
18-29 Jahre	1	150	1,68420	153,22000	30,643814	25,672610	21,802500	31,827800
30-45 Jahre	2	122	3,88130	147,65000	48,430723	29,611111	44,004000	40,191500
46-65 Jahre	0	125	4,32780	169,74000	53,292797	34,758204	50,800000	45,485000
Gesamt	3	397	1,68420	169,74000	43,241108	31,535847	34,587000	41,784500

### Vergleich Studiengruppe / Kontrollgruppe

Die IVB-Antikörperkonzentration war für Kinder und Jugendliche aller Altersgruppen signifikant niedriger als die Konzentration in der Kontrollgruppe ( $p<0.001$ ). Eine Darstellung der Antikörperkonzentrationen mit den jeweiligen statistischen Kenngrößen gibt Abb. 40.

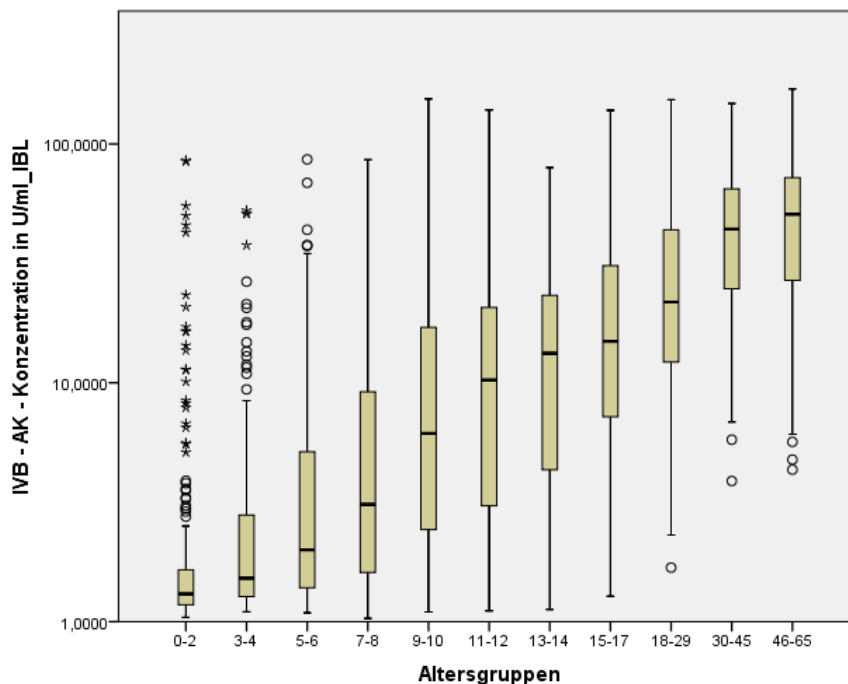


Abb. 37: Altersspezifische Verteilung der IVB-Antikörperkonzentration [U/ml] (IBL) von Kindern, Jugendlichen und erwachsenen Kontrollen (Boxplot: Median, 25. und 75. Perzentil, Minimum, Maximum, (o) >1.5 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box, (\*) >3 facher Interquartilabstand ober-/ unterhalb der Box).

#### 5.4 Vergleich der Influenzavirus A- und B-Seroprävalenzen der Studiengruppe hinsichtlich des Impfstatus

##### Saisonale Influenza

Von den Daten der 1.665 Kinderseren enthielten insgesamt **1.396** (83,84%) Informationen zum saisonalen Influenza-Impfstatus. Die 1.396 Seren wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe der **Geimpften** umfasste 220 (15,76%) Kinder und Jugendliche und die Gruppe der **Nicht-Geimpften** 1.176 (84,24%) Probanden. Mittels der IBL-ELISAs konnte ein Proband (Nicht-Geimpft) nicht ausgewertet werden, da kein Serum mehr vorhanden war.

##### *Seroprävalenzen für Influenza A*

- NovaTec: Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p=0.002$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p<0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 38;  $p<0.001$ ).
- Euroimmun: Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p<0.001$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p<0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 39;  $p=0.040$ ).
- IBL: Die Antikörperprävalenzen stiegen in der Gruppe der Geimpften nicht signifikant mit dem Alter ( $p=0.136$ ), sondern erreichten schon früh konstant Werte von 100%. In der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p<0.001$ ) stiegen die Prävalenzen signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 40;  $p=0.002$ ).

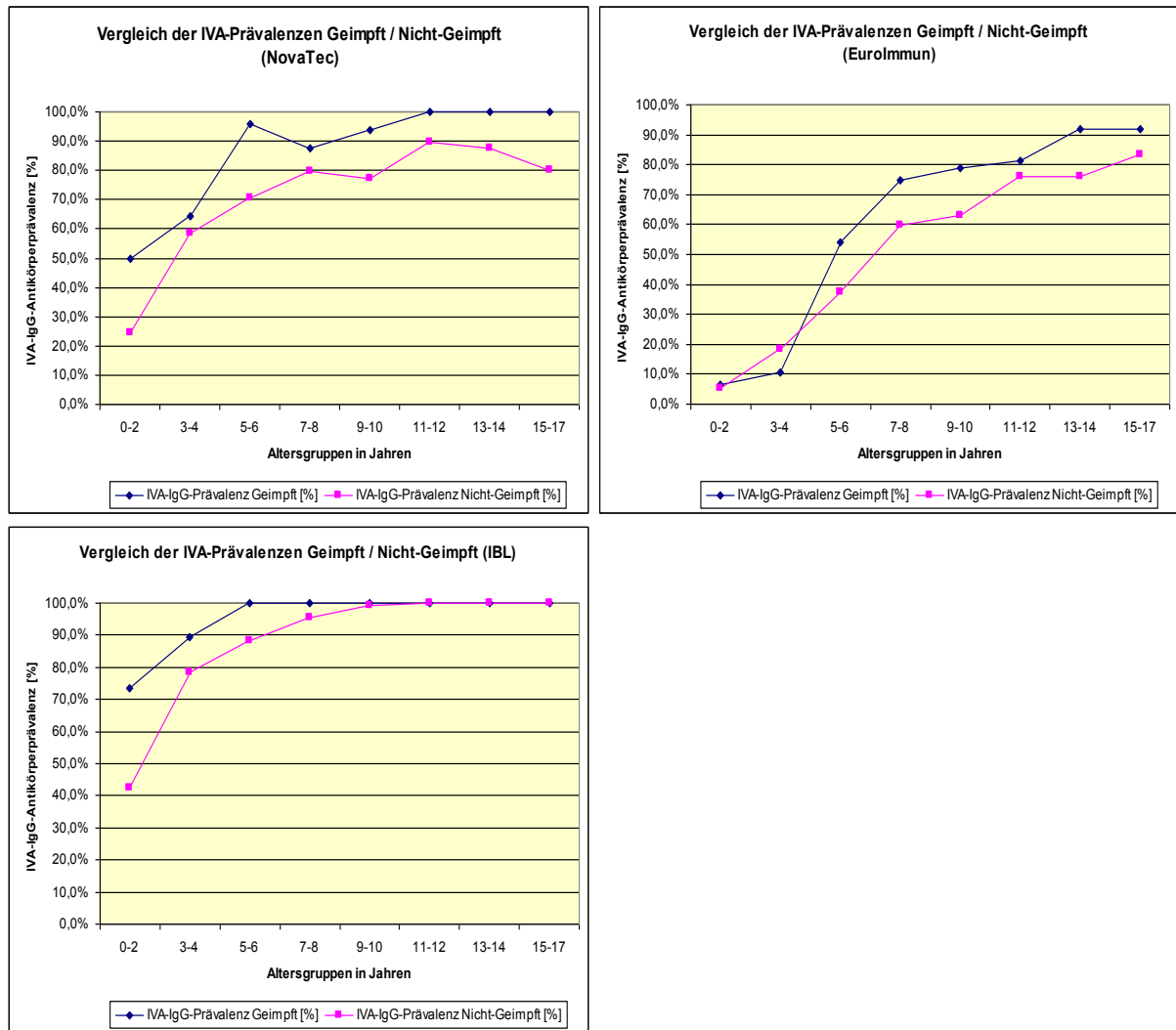


Abb. 38-40: Vergleich der Gruppen in Abhängigkeit der Tests von Geimpften und Nicht-Geimpften hinsichtlich der IVA-Antikörperprävalenz.

### Seroprävalenzen für Influenza B

- **NovaTec:** Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p < 0.001$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p < 0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 41;  $p < 0.001$ ).
- **Euroimmun:** Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p < 0.001$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p < 0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 42;  $p < 0.001$ ).
- **IBL:** Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p < 0.001$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p < 0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 43;  $p < 0.001$ ).

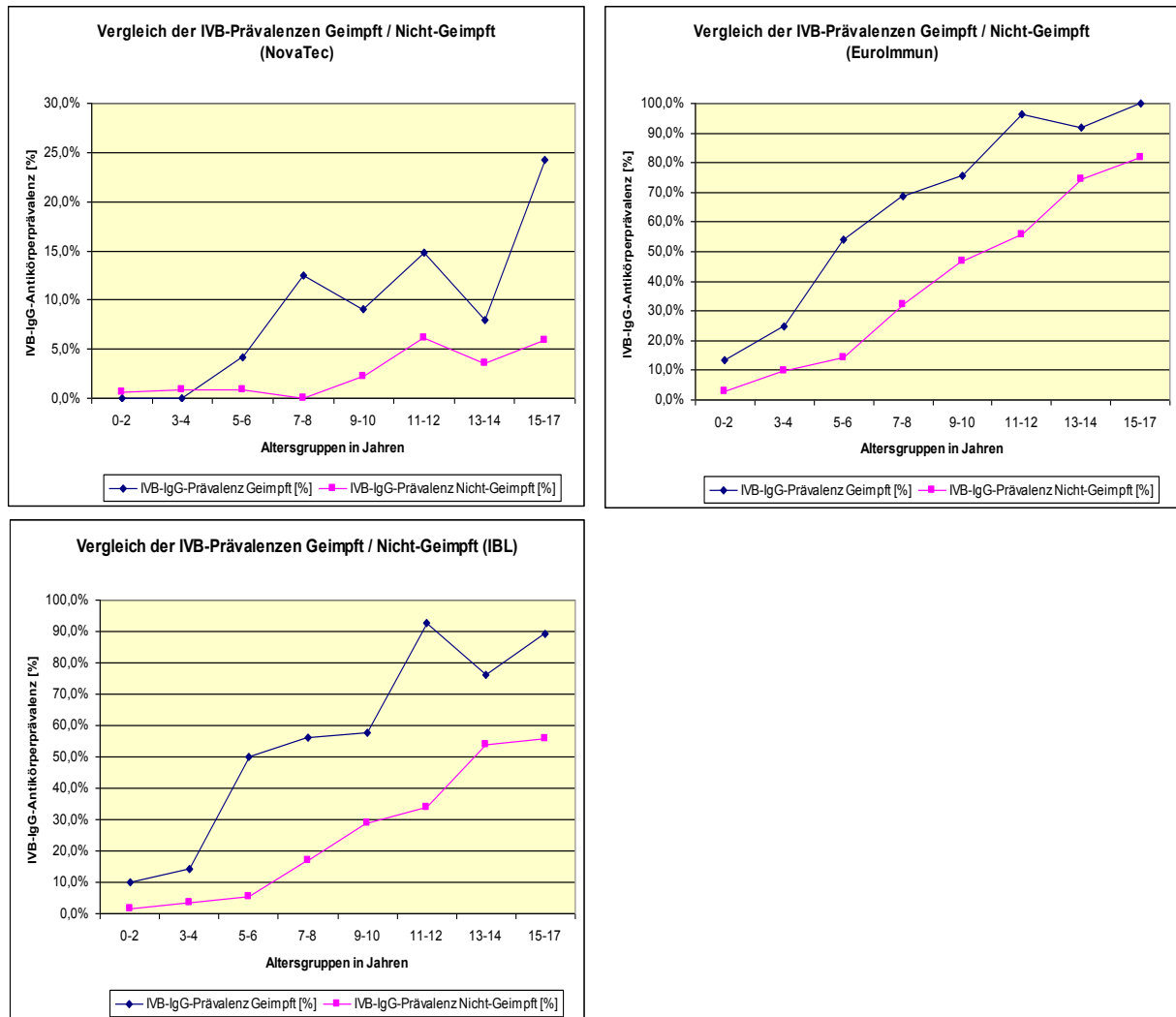


Abb. 41-43: Vergleich der Gruppen in Abhängigkeit der Tests von Geimpften und Nicht-Geimpften hinsichtlich der IVB-Antikörperprävalenz.

### Pandemische Influenza (Influenza A / H1N1 „Schweinegrippe“)

Von den Daten der 1.665 Kinderseren enthielten insgesamt **1.396** (83,84%) Informationen zum Schweineinfluenza-Impfstatus (pandemische H1N1). Die 1.396 Seren wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe der Geimpften umfasste 99 (7,1%) Kinder und Jugendliche und die Gruppe der Nicht-Geimpften 1.297 (92,9%) Probanden. Mittels IBL-ELISA konnte ein Proband (Nicht-Geimpft) nicht ausgewertet werden, da kein Serum mehr vorhanden war.

### Seroprävalenzen für Influenza A

- NovaTec: Die Antikörperprävalenzen stiegen in der Gruppe der Geimpften nicht signifikant mit dem Alter ( $p=0.790$ ), sondern erreichten schon früh konstant Werte von 100%. In der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p<0.001$ ) stieg die Prävalenz signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 44;  $p<0.001$ ).

- Euroimmun: Die Antikörperprävalenzen stiegen sowohl in der Gruppe der Geimpften ( $p < 0.001$ ) als auch in der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p < 0.001$ ) signifikant mit dem Alter. Die Prävalenz war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 45;  $p = 0.001$ ).
- IBL: Die Antikörperprävalenzen stiegen in der Gruppe der Geimpften nicht signifikant mit dem Alter ( $p = 0.478$ ), sondern erreichten in allen Altersgruppen konstant Werte von 100% bzw. fast 100%. In der Gruppe der Nicht-Geimpften ( $p < 0.001$ ) stiegen die Prävalenzen signifikant mit dem Alter. Die Prävalenzen war in der Gruppe der Geimpften signifikant höher als bei den Nicht-Geimpften (Abb. 46;  $p = 0.010$ ).

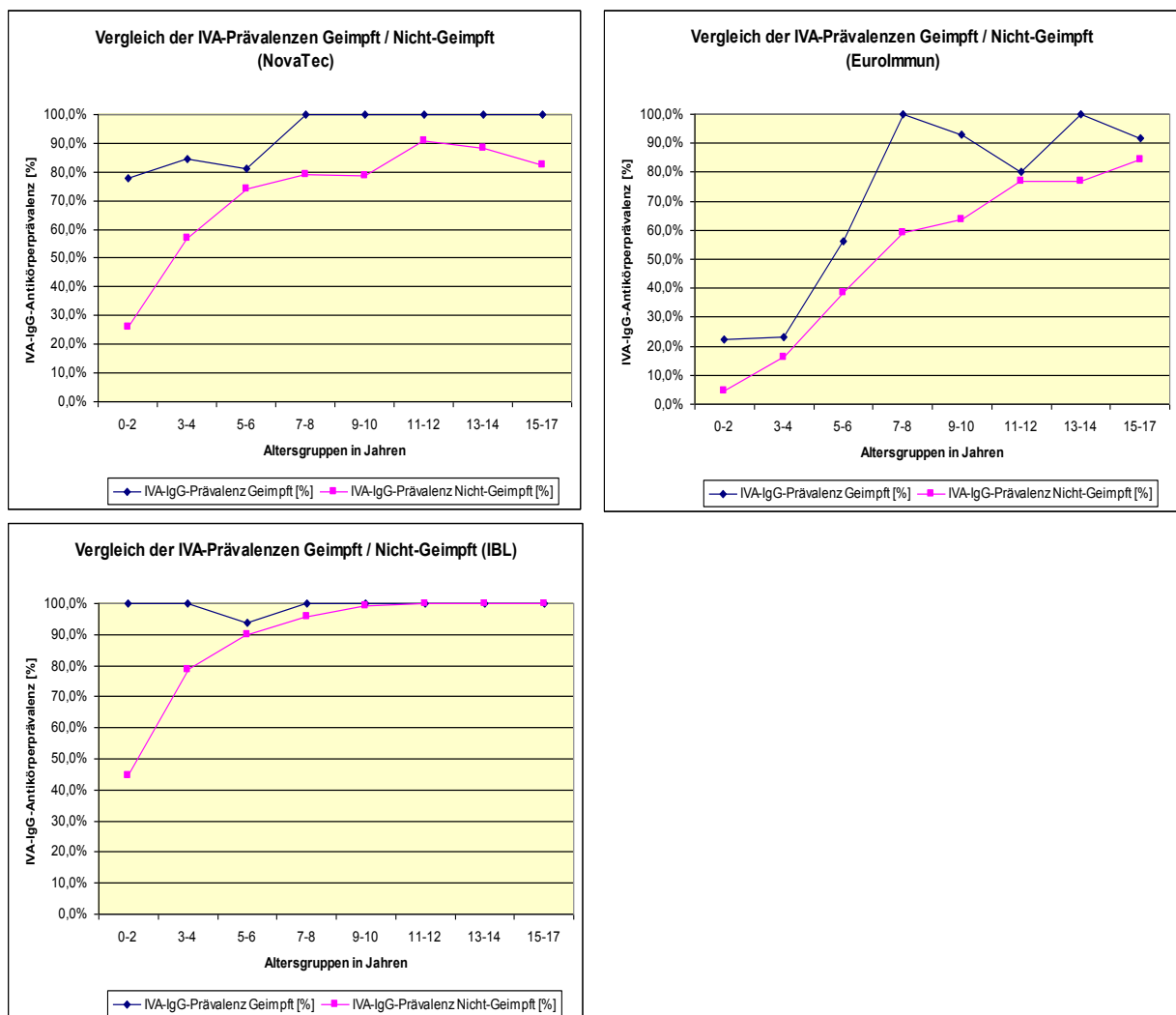


Abb. 44-46: Vergleich der Gruppen in Abhängigkeit der Tests von Geimpften und Nicht-Geimpften hinsichtlich der IVA-Antikörperprävalenz.

## 5.5 Zusammenfassende Darstellung der Seroprävalenzen und der semiquantitativen Antikörperbefunde

### Seroprävalenzen

- Influenzavirus A: Die Gesamtseroprävalenz (Studien- und Kontrollgruppe zusammengefasst) betrug 70,3% [68,3%; 72,3%] beim NovaTec-ELISA, 61,8% [59,7%; 63,9] beim Euroimmun-ELISA und 89,3% [87,9%; 90,6%] beim IBL-ELISA.
- Influenzavirus B: Die Gesamtseroprävalenz (Studien- und Kontrollgruppe zusammengefasst) betrug 10,0% [8,7; 11,4] beim NovaTec-ELISA, 56,9% [54,7%; 59,1%] beim Euroimmun-ELISA und 42,5% [40,4%; 44,7%] beim IBL-ELISA.

Eine detaillierte Übersicht der altersabhängigen Seroprävalenzveränderungen der einzelnen ELISAs sowohl für IVA als auch für IVB gibt Tab. 50, und Abb. 47 stellt diese grafisch dar.

### Semiquantitative Antikörperkonzentrationen

- Influenzavirus A: Die Gesamtkonzentration (arithmetischer Mittelwert bei Zusammenfassung der Studien- und Kontrollgruppe) für den NovaTec-ELISA betrug 17,58 NTU/ml, für den Euroimmun-ELISA 59,83 RE/ml und 62,07 U/ml für den IBL-ELISA.
- Influenzavirus B: Die Gesamtkonzentration (arithmetischer Mittelwert bei Zusammenfassung der Studien- und Kontrollgruppe) für den NovaTec-ELISA betrug 4,73 NTU/ml, für den Euroimmun-ELISA 67,70 RE/ml und 18,41 U/ml für den IBL-ELISA.

Tabelle 51 stellt die altersabhängigen Antikörperkonzentrationen noch einmal im Detail dar.



Tab. 50: Altersabhängige Darstellung der Seroprävalenzen der einzelnen ELISAs. Links für IVA, rechts für IVB.

IVA-ELISA	NovaTec	Euroimmun	IBL	IVB-ELISA	NovaTec	Euroimmun	IBL
Altersgruppe in Jahren	Prävalenz (Prozent)	Prävalenz (Prozent)	Prävalenz (Prozent)	Altersgruppe in Jahren	Prävalenz (Prozent)	Prävalenz (Prozent)	Prävalenz (Prozent)
0-2	26,1	8,1	46,5	0-2	2,2	8,8	4,8
3-4	58,9	17,7	80,0	3-4	1,1	13,7	6,9
5-6	74,2	37,7	89,4	5-6	2,6	22,5	13,9
7-8	80,0	60,0	96,0	7-8	2,3	37,1	21,1
9-10	80,7	64,6	99,0	9-10	4,7	55,2	37,0
11-12	91,5	75,6	100,0	11-12	8,0	64,2	44,3
13-14	88,4	75,4	99,6	13-14	4,9	74,1	54,0
15-17	81,8	84,0	100,0	15-17	9,8	85,5	60,7
Studiengruppe gesamt	71,4	53,5	87,6	Studiengruppe gesamt	4,7	47,0	31,9
18-29	69,5	95,4	99,3	18-29	12,6	96,0	75,5
30-45	65,3	96,8	96,0	30-45	38,7	98,4	93,5
46-65	62,4	97,6	92,8	46-65	48,0	100,0	93,6
Kontrollgruppe gesamt	66,0	96,5	96,3	Kontrollgruppe gesamt	31,8	98,0	86,8
Gesamt-seroprävalenz	70,3	61,8	89,3	Gesamt-seroprävalenz	10,0	56,9	42,5

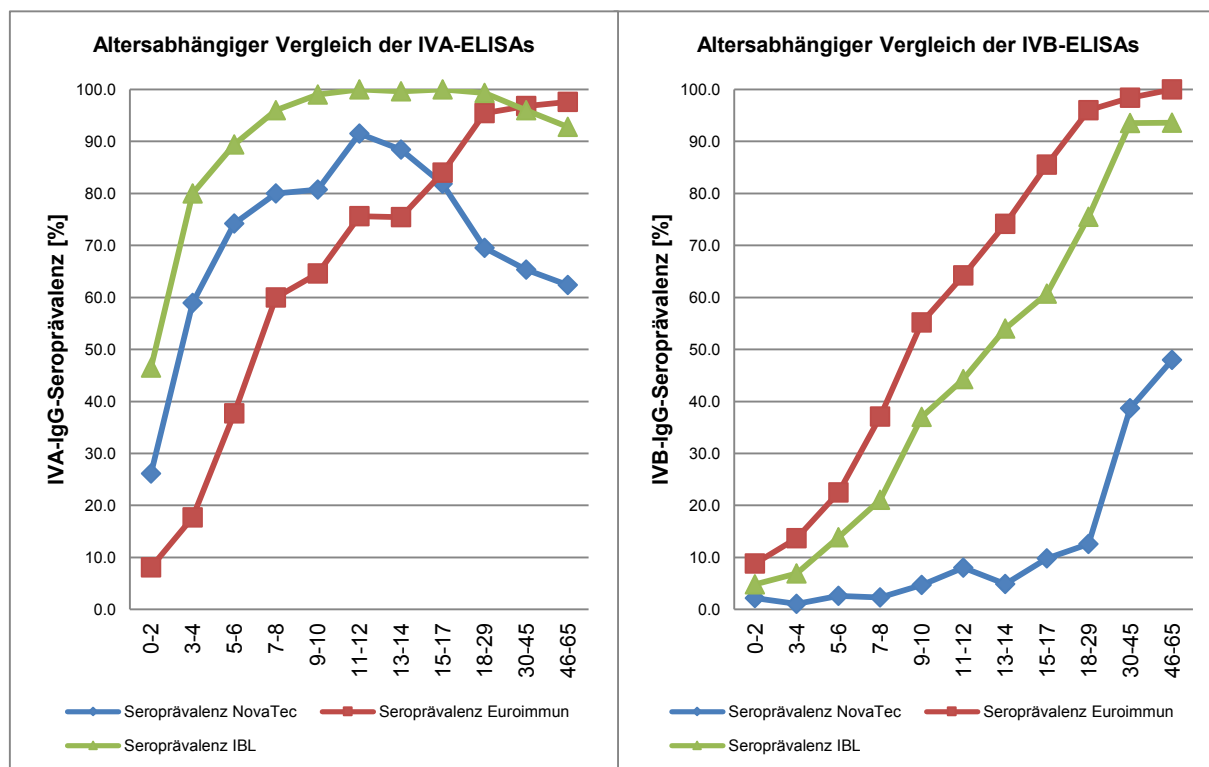


Abb. 47: Darstellung der Seroprävalenzen in Abhängigkeit von den Altersgruppen im Verlauf. Links: IVA; rechts: IVB.

Tab. 51: Antikörperkonzentrationen der einzelnen ELISAs im Vergleich in Abhängigkeit von den Altersgruppen. Links: IVA; rechts: IVB.

IVA-IgG-Konz	NovaTec [NTU/ml]	Euroimmun [RE/ml]	IBL [U/ml]	IVB-IgG-Konz	NovaTec [NTU/ml]	Euroimmun [RE/ml]	IBL [U/ml]
Altersgruppe in Jahren	arithmet. Mittelwert	arithmet. Mittelwert	arithmet. Mittelwert	Altersgruppe in Jahren	arithmet. Mittelwert	arithmet. Mittelwert	arithmet. Mittelwert
0-2 Jahre	9,503735	21,791	21,119262	0-2 Jahre	1,547149	15,180	3,434917
3-4 Jahre	17,742609	20,783	42,302173	3-4 Jahre	1,980727	19,860	4,114833
5-6 Jahre	18,014455	29,499	48,785393	5-6 Jahre	2,449140	29,947	6,250891
7-8 Jahre	19,916913	40,905	69,661154	7-8 Jahre	3,151098	38,025	8,400675
9-10 Jahre	19,610751	48,496	88,443459	9-10 Jahre	4,169104	56,408	13,841937
11-12 Jahre	21,148348	57,814	102,301140	11-12 Jahre	4,620019	66,468	16,460615
13-14 Jahre	20,854528	62,336	105,642016	13-14 Jahre	4,606469	77,015	18,374180
15-17 Jahre	18,704035	73,481	102,718526	15-17 Jahre	5,828312	90,632	22,851100
Studiengruppe gesamt	17,853886	50,122	59,946014	Studiengruppe Gesamt	3,635099	54,666	12,243529
18-29 Jahre	16,759711	97,745	85,748808	18-29 Jahre	6,100565	106,095	30,643814
30-45 Jahre	16,661347	94,164	69,354973	30-45 Jahre	10,057523	127,222	48,430723
46-65 Jahre	17,359466	91,690	66,056347	46-65 Jahre	10,874911	128,245	53,292797
Kontrollgruppe gesamt	16,916642	94,719	72,015886	Kontrollgruppe Gesamt	8,819205	119,312	43,241108
Gesamt-konzentration	17,575911	59,829	62,067864	Gesamt-konzentration	4,727416	67,696	18,408042

## 5.6 Korrelationen der Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Mittels Kappa-Test wurde untersucht, inwieweit die Ergebnisse der IVA- und IVB-ELISAs von NovaTec, Euroimmun und IBL korrelieren. Bei allen Berechnungen wurden die grenzwertigen Befunde als Negativbefunde gewertet.

Der Kappa-Koeffizient, der Werte  $<0$  bis 1 annehmen kann, ist ein gutes Maß für die Einschätzung der Übereinstimmung zweier Schätzwerte. Die Tab. 52 zeigt die Beurteilung des Kappa-Wertes [Landis, Koch. 1977].

Tab. 52: Beurteilung des Kappa-Wertes nach Landis und Koch.

Kappa-Wert	Beurteilung
$<0$	schlechte Übereinstimmung
0 bis 0.2	geringe Übereinstimmung
0.21 bis 0.4	ausreichende Übereinstimmung
0.41 bis 0.6	mittelmäßiger Übereinstimmung
0.61 bis 0.8	beachtliche Übereinstimmung
0.81 bis 1.0	vollkommene Übereinstimmung

In Tab. 53 sind die berechneten Kappa-Koeffizienten für alle Testvergleiche zusammengefasst. Im Vergleich wies der Euroimmun-Test zum NovaTec-Test für IVB nur „geringe Übereinstimmung“ auf, der Euroimmun-Test zum IBL-Test für IVB hingegen eine „beachtliche Übereinstimmung“. Bei den anderen Tests wurden mit Werten zwischen 0.21 und 0.4 „ausreichende Übereinstimmungen“ sowohl für IVA als auch für IVB ermittelt.

Tab. 53: Vergleich der IVA- und IVB-ELISAs untereinander mittels Kappa-Koeffizienten.

Vergleich	ELISA	ELISA	Kappa-Koeffizient	CIU [%]	CIO [%]
IVA-IgG-AK	NovaTec	Euroimmun	0.313	0.271	0.355
IVA-IgG-AK	NovaTec	IBL	0.391	0.349	0.433
IVA-IgG-AK	Euroimmun	IBL	0.285	0.250	0.320
IVB-IgG-AK	NovaTec	Euroimmun	0.151	0.131	0.172
IVB-IgG-AK	NovaTec	IBL	0.256	0.225	0.287
IVB-IgG-AK	Euroimmun	IBL	0.716	0.688	0.745

## 6 Diskussion

### 6.1 Vergleich und Evaluation der Enzyme-linked Immunosorbent Assays

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Seroprävalenz von IVA und IVB bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland im Alter von 0 bis 17 Jahren mithilfe verschiedener kommerzieller ELISAs zum Nachweis virusspezifischer IgG-Antikörper. Bereits 1976 wurde der ELISA als sensitives Verfahren zum IVA-Antikörnernachweis beschrieben [Leinikki und Pässilä. 1976]. Im Vergleich zu anderen etablierten Methoden wie dem HAHT oder der KBR besitzt das ELISA-Verfahren eine höhere Sensitivität bei der Bestimmung Influenzavirus-spezifischer IgG-Antikörper [Bishai und Galli. 1978, Julkunen et al. 1984]. Die zur Prävalenzbestimmung verwendeten kommerziellen ELISAs stammten von den Firmen NovaTec, Euroimmun sowie IBL und sollten im Rahmen dieser Studie miteinander hinsichtlich ihrer Methodik, der Prävalenzergebnisse für IVA und IVB getrennt sowie ihren Vor- und Nachteilen verglichen werden. Darüber hinaus sollte die Korrelation der einzelnen ELISAs für IVA und IVB berechnet werden.

### Methodik

Eine Zusammenfassung der von den Herstellern verwendeten Antigene und deren Herkunft zeigt Tab. 54. Diese Antigene liegen festphasenfixiert vor und detektieren vorwiegend IgG-Antikörper gegen IVA- und IVB-spezifische MP und NP im Probenmaterial. Beide Proteine gelten als genetisch hoch konserviert und unterliegen demzufolge nur wenigen genetischen Veränderungen, wie dies vergleichsweise für das HA und die NA der Fall ist [Londo et al. 1983, Watanabe et al. 1999, Heiny et al. 2007, Tompkins et al. 2007]. Dadurch ist eine subtypenunabhängige Bestimmung von IVA-IgG-Antikörpern möglich und eine jährliche Anpassung des viralen Antigens an die saisonalen Stämme im Gegensatz zum HAHT nicht erforderlich [Voeten et al. 1998]. Auch eine Interferenz mit Impfantikörpern sollte nicht auftreten, da in Deutschland aktuell Split-Vakzine mit HA und NA als Antigene verwendet werden [FachInfo-Service. 2013], die die aktuell von der WHO empfohlene Antigenkombination enthalten [Robert Koch-Institut. 2013]. Auf den Einfluss einer vorangegangenen Impfung bezüglich der Seroprävalenzergebnisse dieser Studie wird nachfolgend (Seite 95) noch näher eingegangen.

Tab. 54: Verwendete Antigene der kommerziellen ELISAs.

Firma	ELISA	Antigen	Virusstamm
NovaTec	IVA	Typspezifische Matrix- und Ribonukleoproteine	A/H3N2/Texas/1/77
Euroimmun	IVA	Typspezifische Vollantigene mit hohem Anteil an Matrix- und Nukleoprotein	A/H3N2/Texas A/H1N1/California/7/2009 (porcin) A/H1N1/Singapore
IBL	IVA	Inaktiviertes IVA mit hohem Anteil an Matrix- und Ribonukleoprotein	A/H3N2/Sydney/5/97 A/H1N1/Beijing/262/95
NovaTec	IVB	Typspezifische Matrix- und Ribonukleoproteine	B/Hongkong/5/72
Euroimmun	IVB	Typspezifische Vollantigene mit hohem Anteil an Matrix- und Nukleoprotein	B/Hongkong/5/72
IBL	IVB	Inaktiviertes IVB mit hohem Anteil an Matrix- und Ribonukleoprotein	B/Harbin/7/94

#### Testvorbereitung, Testdurchführung und Testauswertung

Bei der Vorbereitung der Proben und der Kits gab es keine wesentlichen Unterschiede. Die Kits aller drei Firmen lagerten bei 2-8°C im Kühlraum, die Serumproben bei -20°C im Kühlfach. Alle wurden vor Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht. Dies sollte mindestens eine Zeit von 90 min in Anspruch nehmen.

Die Testdurchführung war für Influenza A und B jeweils gleich. Die Probenverdünnung wurde im Verhältnis 1 + 100 mit 10 µl Probe und 1 ml Verdünnungspuffer durchgeführt. Von den Verdünnungen wurden dann 100 µl in die Kavitäten der Mikrotiterplatten je nach Schema pipettiert. In diesem Schritt wurden auch die von den Firmen in unterschiedlicher Form mitgelieferten Kalibratoren und Kontrollen je nach Pipettierschema der Firma eingebracht.

In der Auswertung arbeitete NovaTec mit Substratleerwert (leere Kavität), einer Negativkontrolle, einer Cut-off-Kontrolle (in 2 Kavitäten zur Mittelwert-Berechnung) und einer Positivkontrolle. Damit war eine qualitative Auswertung sowie eine semiquantitative Testauswertung mithilfe der Berechnung von NovaTec-Einheiten nach einer Formel möglich (siehe 4.2.2). Die Programmierung der Software des Photometers mit dieser Formel war jedoch zeitaufwändiger als die Definition und Berechnung von Standardkurven. Euroimmun verwendete Negativ- und Positivkontrolle sowie drei Kalibratoren, mit denen eine semiquantitative Auswertung mithilfe einer Standardkurve aus den Kalibratoren möglich war (siehe 4.2.3). IBL nutzte

die Standards A bis D, die mithilfe einer Standardkurve eine semiquantitative Auswertung ermöglichte (siehe 4.2.4). Die Ermittlung der Seroprävalenz und der Antikörperkonzentrationen wurden bei NovaTec und Euroimmun in Doppel- und bei IBL aufgrund der geringeren Anzahl der zur Verfügung stehenden Testkits in Einzelbestimmung durchgeführt.

Nach einer Proben-Inkubationszeit von 60 min bei NovaTec (im Inkubator bei 37°C) und Euroimmun (bei Raumtemperatur) sowie 30 min bei IBL (bei Raumtemperatur), erfolgte ein erster Waschschrift mithilfe eines automatischen Strip-Washers mit für die jeweiligen ELISAs unterschiedlichen Wiederholungen sowie Waschlösungsvolumina und -verdünnungen, die im Methodenteil (siehe 4.2.2 bis 4.2.4) näher beschrieben sind. Im Anschluss wurde das Enzymkonjugat in alle Kavitäten pipettiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Nach einem zweiten Waschschrift und der Zugabe der Substratlösung folgte eine weitere Inkubationszeit von 15 min bei den NovaTec- und Euroimmun-ELISAs und 20 min bei den IBL-ELISAs. Anschließend erfolgten die Zugabe der Stopplösung und die photometrische Auswertung. Bei der Dauer der Testdurchführung unterschieden sich die drei ELISAs nicht wesentlich: NovaTec und IBL etwa 6 Stunden, Euroimmun 5,5 Stunden unter Berücksichtigung aller Inkubationszeiten, Waschschriffe, Pipettiervorgänge und der Messung.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass hinsichtlich der Testmaterialien und Kitsysteme, der Testvorbereitung, -durchführung und -auswertung keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei ELISAs bestanden. Zudem sind die ELISAs sowohl von der Firma NovaTec als auch von den Firmen Euroimmun und IBL mit einer verständlichen und mehrsprachigen Arbeitsanleitung ausgestattet [Euroimmun Medizinische Labordiagnostika. 2011, IBL International GmbH. 2012, NovaTec Immundiagnostica GmbH 2011].

### **Vergleich der Ergebnisse**

Eine vergleichende Gegenüberstellung der Seroprävalenzen und der Antikörperkonzentrationen der drei ELISAs für IVA und IVB zeigen die Tabellen 50 und 51 (Seite 82 u. 83) sowie Abb. 47 (Seite 82).

### **Influenzavirus A-Seroprävalenz**

Die höchste Detektionsrate IVA-spezifischer IgG-Antikörper erreichte der IBL-ELISA mit einer Gesamtprävalenz von 89,3%. Etwa zwanzig Prozentpunkte weniger konnte

der ELISA von NovaTec mit 70,3% nachweisen. Die niedrigste Detektionsrate wies der Euroimmun-Test mit 61,8% auf. Diese starken Differenzen in der Gesamtprävalenz könnten damit erklärt werden, wie effektiv die verwendeten Antigene an die Festphase mobilisiert werden konnten, in welcher Affinität sie IgG-Antikörper des Serums binden und in welchem Maße die Antigen-Antikörper-Komplexe beim Waschen ausgespült werden. Auch die Konzentration des Enzymkonjugats, bestehend aus Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen humanes IgG, könnte eine Rolle spielen. Die Ergebnisse sprechen hier eindeutig für den ELISA der Firma IBL, vor allem unter Berücksichtigung der Befunde einer ähnlichen aktuellen Studie aus den Niederlanden [Bodewes et al. 2011]. Dass die verwendeten MP und NP, die als genetisch hoch konserviert gelten [Londo et al. 1983, Watanabe et al. 1999, Heiny et al. 2007, Tompkins et al. 2007] und subtypenunabhängig IVA- und IVB-spezifische IgG-Antikörper detektieren, die Prävalenzergebnisse der einzelnen ELISAs beeinflusst haben könnte, ist wenig wahrscheinlich. Allerdings enthielten die eingesetzten ELISAs von Euroimmun und IBL neben MP und NP noch andere virale Antigene.

In der Gruppe der Kinder und Jugendlichen stiegen die Seroprävalenzen bei allen drei ELISAs kontinuierlich mit dem Alter an, wobei beim NovaTec-ELISA in der Altersgruppe 11-12 Jahre ein Gipfel erreicht wurde und die Prävalenz danach wieder leicht absank. Beim IBL-Test wurde schon in der Altersgruppe 9-10 Jahre eine Seroprävalenz von fast 100% erreicht und blieb bis zum Alter von 15-17 Jahren konstant. Der IBL-ELISA erreichte in der Studiengruppe der Kinder und Jugendlichen die höchsten Gesamtprävalenzraten von 87,6%. Diese lagen damit deutlich über denen von NovaTec (71,4%) und Euroimmun (53,5%). Die Prävalenzen der Erwachsenen-Kontrollgruppe lagen beim Euroimmun- und IBL-ELISA bei etwa 96%, wobei beim Euroimmun-Test die Prävalenzen mit zunehmendem Alter zu- und beim IBL-ELISA abnahmen. Der NovaTec-Test lag mit einer Prävalenz von 66% rund 30 Prozentpunkte unter den Ergebnissen der anderen beiden Teste in der Erwachsenen-Kontrollgruppe, und die Prävalenz nahm wie beim IBL-Test mit zunehmendem Alter ab. Die niedrigeren Seroprävalenzen in höherem Alter im Vergleich zu den hohen Raten im Jugendalter von 11-17 Jahren sprechen für eine Alterung des Immunsystems mit einer Abnahme der Konzentration an Immunglobulinen [Weinke. 2012], was auch IVA- und IVB-spezifische IgG-Antikörper betrifft.

### Influenzavirus A-Antikörperkonzentrationen

Die Antikörperkonzentrationen der einzelnen ELISAs sind aufgrund der differenten Standardseren bzw. Kalibratoren der Firmen und der unterschiedlichen Auswertung schwer miteinander zu vergleichen. Nachteilig machte sich bemerkbar, dass kein internationaler Standard zur Verfügung stand. Es ließ sich erkennen, dass die Antikörperkonzentrationen beim Euroimmun- und IBL-ELISA in der Erwachsenen-Kontrollgruppe deutlich höher waren als in der Studiengruppe der Kinder und Jugendlichen. In der Studiengruppe stieg die Konzentration mit dem Alter, in der Kontrollgruppe sank sie ab. Der NovaTec-ELISA wich vom Verhalten der anderen beiden Teste leicht ab. So war die Antikörperkonzentration in der Studiengruppe etwa gleich der Kontrollgruppe. Sie stieg mit dem Alter, um ein Maximum in der Altersgruppe von 11-12 Jahren zu erreichen, sank dann wieder leicht ab und blieb mit zunehmendem Alter konstant auf einem Niveau. Dass die Konzentrationen IVA-spezifischer IgG-Antikörper bei Erwachsenen höher sind als bei Kindern und Jugendlichen, könnte an der zunehmenden Anzahl der Reinfektionen und Neuinfektionen mit anderen IVA-Subtypen liegen. Die Folge ist eine Boosterung der Immunabwehr, sodass vermehrt IgG-Antikörper gebildet werden. Die kontinuierliche Abnahme der Antikörperkonzentrationen mit zunehmendem Alter könnte wiederum in Zusammenhang mit der Alterung des Immunsystems stehen [Weinke. 2012].

### Influenzavirus B-Seroprävalenz

Mit einer Gesamtprävalenz von 56,9% erreichte der ELISA der Firma Euroimmun die höchste Detektionsrate IVB-spezifischer IgG-Antikörper, gefolgt vom IBL-Test mit 42,5%. Eine deutliche Diskrepanz wies jedoch der NovaTec-ELISA auf, der lediglich eine Positivrate von 10% detektierte. Diese ausgeprägten Unterschiede in der Gesamtprävalenz könnten, wie bei IVA zuvor schon erwähnt, damit erklärt werden, wie effektiv die verwendeten Antigene an die Festphase mobilisiert werden konnten, in welcher Affinität sie IgG-Antikörper des Serum binden und in welchem Maße die Antigen-Antikörper-Komplexe beim Waschen ausgespült werden. Auch die Konzentration des Enzymkonjugats könnte eine Rolle spielen. Die Ergebnisse sprechen hier eindeutig für den ELISA der Firma Euroimmun. Zum einen weist der Test die höchste Detektionsrate der untersuchten ELISAs auf, zum anderen zeigen die Ergebnisse die beste Übereinstimmung mit bereits publizierten Resultaten in ähnlichen Altersgruppen [Schmidt-Ott et al. 2007]. Der IVB-Stamm, aus dem die verwendeten



Antigene isoliert wurden, spielt hier höchstwahrscheinlich keine bedeutende Rolle. Influenzavirus B wird nicht in HA- und NA-Subtypen untergliedert wie IVA, sondern man unterscheidet zwei Linien: die Victoria- und Yamagata-Linie [Robert Koch-Institut. 2011]. Diese Unterscheidung der IVB-Linien wird seit den 1980er Jahren vorgenommen. Der von NovaTec und Euroimmun verwendete Stamm B/Hongkong/5/72 stammt aus der Zeit davor, der von IBL verwendete Stamm B/Harbin/7/94 gehört der Yamagata-Linie an. Die einzelnen Linien differieren zwar in ihren antigenen Eigenschaften, durch die Verwendung von MP und NP-Antigenen anstelle konzentrierter HA- oder NA-Antigene kann jedoch von starken Kreuzreaktionen zwischen den Linien ausgegangen werden. Sowohl in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen als auch in der Erwachsenen-Kontrollgruppe stiegen die Seroprävalenzen bei allen drei ELISAs kontinuierlich mit dem Alter an und waren in der Erwachsenen-Kontrollgruppe deutlich höher als in der Studiengruppe der Kinder und Jugendlichen. Die Gesamtprävalenz war in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit 47% beim Euroimmun-Test am höchsten. Beim NovaTec-ELISA betrug sie nur ein Zehntel davon (4,7%). Der ELISA der Firma IBL erreichte ein Ergebnis von 31,9%. In der Erwachsenen-Kontrollgruppe zeigten die Tests von Euroimmun (98%) und IBL (86,8%) ähnliche Resultate und unterschieden sich nur in etwa 11 Prozentpunkten. Der NovaTec-ELISA erreichte lediglich eine Positivrate von 31,8%. Dass die Prävalenz IVB-spezifischer IgG-Antikörper bei Erwachsenen höher ist als bei Kindern und Jugendlichen, könnte an der höheren Zahl an Neu- und Reinfektionen liegen, die nötig sind, um eine natürliche Immunität aufzubauen. Zudem persistiert die Immunität nach Erstinfektion bei Kindern nur für eine kürzere Zeit als bei Erwachsenen [Corbel. 2007].

#### Influenzavirus B-Antikörperkonzentrationen

Die Antikörperkonzentrationen der einzelnen ELISAs sind aufgrund der differenten Standardseren bzw. Kalibratoren der Firmen und der unterschiedlichen Auswertung, vor allem aber durch das Fehlen eines internationalen Standards schwer miteinander zu vergleichen. Es lässt sich festhalten, dass sowohl in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen als auch in der Erwachsenen-Kontrollgruppe die Konzentrationen bei allen drei ELISAs kontinuierlich mit dem Alter anstiegen und in der Kontrollgruppe deutlich höher waren als in der Studiengruppe. Dies spricht wiederum für eine Boosterung der Antikörperbildung im Rahmen von Reinfektionen. Die IVB-

Antikörperkonzentrationen waren beim NovaTec- und IBL-ELISA deutlich geringer als die IVA-Antikörperkonzentrationen, beim Euroimmun-ELISA waren die IVB-Antikörperkonzentrationen höher als die Antikörperkonzentrationen gegen IVA. Die Werte beim ELISA der Firma Euroimmun könnten für eine eventuelle Kreuzreaktivität zwischen IVA- und IVB-spezifischen Antikörpern sprechen. Darauf wird auf Seite 95 noch näher eingegangen. Die deutlich niedrigeren Antikörperkonzentrationen für IVB (NovaTec, IBL) sprechen dafür, dass das Immunsystem der Probanden sich mit deutlich weniger IVB-Neuinfektionen und -Reinfektionen auseinandersetzen musste, als dies für IVA der Fall war. Der Grund liegt auch darin, dass IVA für den Großteil epidemischer Ausbrüche verantwortlich ist sowie jährlich und meist weltweit zirkuliert. Influenzavirus B zirkuliert in Deutschland hingegen saisonal nur sporadisch und periodisch alle 2-3 Jahre als meist kodominantes Virus (Saison 1996/97, 1998/99, 2001/02, 2007/08, 2012/13) [Arbeitsgemeinschaft Influenza. 1997, 1999, 2002, 2008; Robert Koch-Institut. 2013]. Eine alleinige Dominanz des IVB in einer Saison ist dagegen sehr selten (Saison 2005/06) [Arbeitsgemeinschaft Influenza. 2006]. Zudem ist die Zirkulation von IVB-Stämmen meist regional begrenzt [Arbeitsgemeinschaft Influenza. 1997-2008, Robert Koch-Institut. 2009-2013].

### **Sensitivität und Spezifität der Teste**

Die Firma NovaTec gibt für ihren IVA-ELISA eine Sensitivität von über 95% und eine Spezifität von 91,7% an, für den IVB-ELISA 95,8% Sensitivität und 86,7% Spezifität [NovaTec Immundiagnostica GmbH. 2011]. Dabei wurden als Standard ELISAs der Firma VIROIMMUN Labordiagnostika verwendet. Euroimmun macht zur Sensitivität und Spezifität der Teste keine konkreten Angaben. Es wird lediglich erwähnt, dass zur Referenzbereichsbestimmung Konzentrationen der IVA-/ IVB-Antikörper bei 500 bzw. 300 Blutspendern ermittelt wurden und dass bei einem Cut-off von 20 RE/ml 90,6% der Blutspender IVA-IgG-positiv und 76,7% IVB-IgG-positiv waren. Diese beiden Angaben werden im Folgenden als Wert für die Sensitivität verwendet, die vom Hersteller angegeben wurde [Euroimmun Medizinische Labordiagnostika. 2011]. Eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von jeweils über 95% besitzt laut Informationen des Herstellers der IBL-ELISA sowohl für IVA als auch für IVB [IBL International GmbH. 2012]. Anhand der Herstellerangaben zur Sensitivität der Teste ergibt sich folgende Rangfolge für IVA: IBL >95%, NovaTec >95%, Euroimmun 90,6%. Dies entspricht auch der Rangfolge der Detektion IVA-spezifischer IgG-Antikörper

hinsichtlich der Gesamtprävalenz dieser Studie. Für IVB ergibt sich hinsichtlich der Sensitivität folgende Rangfolge: IBL >95%, NovaTec 95,8%, Euroimmun 76,7%. Dies steht jedoch nicht im Einklang mit den Daten der IVB-Seroprävalenz dieser Arbeit, für die sich nachfolgende Rangfolge ergab: Euroimmun 56,9%, IBL 42,5%, NovaTec 10%. In weiteren Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität der eingesetzten ELISAs außerhalb dieser Arbeit [Sauerbrei. 2012] ließ sich feststellen, dass für die Bestimmung der Seroprävalenz gegenüber IVA der ELISA von IBL die höchste Sensitivität aufweist und gegenüber IVB der ELISA von Euroimmun. Dazu wurden zunächst Serumproben von 66 Schwangeren und deren Neugeborenen, die parallel zum Zeitpunkt der Geburt entnommen wurden, untersucht. Die Seren stammten aus der Studie „Seroprävalenz von Influenza A und B bei Schwangeren und deren Nachkommen“, die 2006 bis 2008 durchgeführt wurde [Wutzler et al. 2009]. Alle 66 Neugeborenen waren im IVB-ELISA von NovaTec positiv, während nur 32 der entsprechenden Mütter IgG-Antikörper gegen IVB aufwiesen. Die Testung mittels IVB-ELISA von Euroimmun bestätigte die 66 positiven Seren der Neugeborenen, während nahezu alle Schwangeren (64) ebenfalls positiv waren. Im IVB-ELISA von IBL waren alle 66 Neugeborene und 62 Schwangere positiv. Darüber hinaus wurden 50 Seren von Kindern und Jugendlichen im Alter von 2-5 Jahren der Vorgängerstudie [Sauerbrei et al. 2009] getestet, die im IVA-ELISA von NovaTec positiv und im IVB-ELISA von NovaTec negativ waren. Von diesen Seren waren lediglich 25 im IVA-ELISA von Euroimmun positiv, während im entsprechenden ELISA von IBL analog zum NovaTec-ELISA alle 50 Seren positiv getestet wurden. Im Vergleich zum NovaTec-ELISA zeigte der IBL-ELISA jedoch höhere Antikörperkonzentrationen. Im IVB-ELISA von Euroimmun waren 19 und im IVB-ELISA von IBL 14 Seren positiv, die im entsprechenden NovaTec-ELISA negativ waren.

Trotz dieser weiteren Validierungsuntersuchungen lässt sich festhalten, dass präzise Aussagen hinsichtlich Sensitivität und vor allem zur Spezifität nicht möglich waren. Dies lag im Wesentlichen auch daran, dass keine validierten Standardseren mit definierten Antikörperkonzentrationen zur Verfügung standen. Darüber hinaus ist das Verfahren des ELISA zur Bestimmung Influenzavirus-spezifischer Antikörper keine diagnostische Routinemethode, sodass es bisher keine validierten ELISAs gibt und dementsprechend nur wenig Erfahrung über die Qualität dieser Methode als Nachweisverfahren. Auch ein Referenztest steht aktuell nicht zur Verfügung. Ein Vergleich des ELISA-Verfahrens mit dem HAHT wäre möglich, doch dazu gibt es

zurzeit keinerlei Studien. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach den Untersuchungen dieser Arbeit, den weiteren Validierungsuntersuchungen [Sauerbrei. 2012] und durch die breite Übereinstimmung mit ähnlichen Studien [Schmidt-Ott et al. 2007, Bodewes et al. 2011] der IVA-ELISA von IBL und der IVB-ELISA von Euroimmun am sensitivsten IVA-/IVB-Antikörper detektieren und somit für die Ermittlung der Seroprävalenz von Influenza A und B am besten geeignet sind. Insbesondere erwiesen sich der IVA-ELISA von Euroimmun und der IVB-ELISA von NovaTec aufgrund ihrer zu geringen Sensitivität für die Seroprävalenzbestimmung von IVA bzw. IVB als wenig brauchbar.

### **Vor- und Nachteile des Enzyme-linked Immunosorbent Assays im Vergleich zum Hämagglutinationshemmtest**

Zur Bestimmung der Subtypen- (IVA) und Linien-spezifischen (IVB) Immunantwort wird der HAHT als „Goldstandard“ eingesetzt [Julkunen et al. 1985]. Für seinen Einsatz ist jedoch die Auswahl repräsentativer Virusstämme notwendig. Dies und der große zeitliche und materielle Aufwand sind Gründe, weshalb der HAHT für große Prävalenzstudien wenig geeignet erscheint [Sauerbrei. 2012]. Dennoch wurde der HAHT bis heute als Standard zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Influenzaviren in Prävalenzstudien eingesetzt. Hämagglutinationshemm-Titer gelten als Korrelat zur Bestimmung der IVA- bzw. IVB-Immunität [Yeolekar et al. 2001, Bodewes et al. 2011, Waalen et al. 2012]. Durch die Subtypen- und Linien-Spezifität des HAHT und durch eine ungeeignete Auswahl des Virus-Antigens kann die wahre Seroprävalenz in solchen Studien jedoch unterschätzt werden [Tse et al. 2012]. Enzyme-linked Immunosorbent Assays, die subtypen- und linienübergreifend IVA- und IVB-spezifische Antikörper bestimmen, scheinen de facto besser dazu geeignet, IVA- und IVB-Seroprävalenzen zu erfassen. Jedoch gibt es dazu noch wenige Erfahrungen in Studien und, wie bereits erwähnt, keine validierten ELISAs. Dennoch wurden erste ELISAs mit subtypen-unabhängigen MP und NP als Antigen erfolgreich in Studien zur Seroprävalenzbestimmung von Influenzaviren sowohl bei Schweinen als auch beim Menschen eingesetzt [Sauerbrei et al. 2009, Wutzler et al. 2009, Tse et al. 2012]. Die Evaluierung und Validierung ist deshalb ein wichtiges Ziel der aktuellen Arbeit. Diese geringe Erfahrung ist aktuell ein Nachteil der ELISAs, wohingegen der HAHT schon über viele Jahre als Methode der Wahl in Prävalenzstudien eingesetzt wurde, wie z.B. in Studien von Schmidt-Ott et al. [2007] und Bodewes et al. [2011]. Vorteile des ELISAs

sind der geringere Aufwand hinsichtlich der Faktoren Zeit und Kosten [Kamps et al. 2006] und die höhere Sensitivität gegenüber dem HAHT [Bishai und Galli. 1978, Julkunen. 1985]. Der HAHT ist zudem arbeitsintensiver, für eine Automatisierung nicht zugänglich und kommerziell nicht verfügbar, was ihn für groß angelegte Studien ungeeignet erscheinen lässt [Sauerbrei et al. 2014]. Ein Nachteil des IgG-ELISAs ist, dass er zwar durchgemachte Infektionen mit IVA bzw. IVB nachweist, aber mit Ausnahme der Serokonversion keine Aussage über den Infektionszeitpunkt zulässt [Sauerbrei. 2014]. Dafür wären IgM- und IgA-ELISAs notwendig, die bei Influenzavirus-Infektionen jedoch nur von geringer Aussagekraft sind [Webster. 1968, Beyer et al. 1986]. Darüber hinaus korrelieren Antikörper gegen MP und NP, die mittels der ELISAs nachgewiesen werden, nicht mit dem Schutz gegen die Influenza. Auch wenn IgG-Antikörper gegen Influenzavirus-spezifische MP- und NP-Antigene nur wenig zur humoralen Immunität beitragen, zeigen sie aber eine subtypen-unabhängige T-Zell-vermittelte Immunität an [Cinatl et al. 2007]. Im Gegensatz dazu korrelieren Antikörpertiter im HAHT mit einem immunologischen Schutz vor der Influenza [Black et al. 2011].

### **Korrelation der Enzyme-linked Immunosorbent Assays**

Die Korrelation zwischen den einzelnen IVA- bzw. IVB-ELISAs wurde in dieser Arbeit mittels des Kappa-Tests nach Landis und Koch untersucht, der ein gutes Maß für die Übereinstimmung zweier Schätzwerte ist [Landis und Koch. 1977]. Tabelle 52 (Seite 83) gibt eine Übersicht zur Bewertung der in Tab. 53 (Seite 84) aufgelisteten Kappa-Koeffizienten bezüglich der Vergleiche der einzelnen ELISAs untereinander (Abschnitt 5.6). Lediglich die IVB-ELISAs von Euroimmun und IBL korrelierten entsprechend einem Kappa-Koeffizienten von 0.716 mit einer beachtlichen Übereinstimmung. Alle anderen ELISAs korrelierten bei Werten von 0.151 (IVB-ELISA von NovaTec mit Euroimmun) mit geringer Übereinstimmung bzw. Werten von 0.256 (IVB-ELISA von Novatec mit IBL), 0.313 (IVA-ELISA von NovaTec mit Euroimmun), 0.391 (IVA-ELISA von NovaTec mit IBL) und 0.285 (IVA-ELISA von Euroimmun mit IBL) mit ausreichender Übereinstimmung. Bei den IVA-ELISAs erreichte der Vergleich der Tests von NovaTec und IBL mit 0.391 den höchsten Wert. Dies impliziert, dass ein positives Resultat bei dem einen Test nicht unbedingt ein solches beim anderen Test nach sich zieht. Durch diese eher mäßige Korrelation der Tests untereinander machen sich die ELISAs noch schlechter vergleichbar. Zusammenfassend ließen sich nur

mäßige bis schlechte Übereinstimmungen der Ergebnisse im Vergleich der kommerziellen ELISAs miteinander feststellen. Es ist deshalb erforderlich, entsprechende Tests für die Untersuchung der Influenza-Seroprävalenz vor ihrem Einsatz zu evaluieren. Es wäre die Aufgabe der Hersteller, z.B. über den Austausch von Standardseren die Vergleichbarkeit der vertriebenen Tests zu bewerten.

### **Kreuzreaktivität der Enzyme-linker Immunosorbent Assays**

Laut Herstellerangaben sind für die ELISAs der Firmen NovaTec und IBL keine Kreuzreaktivitäten bekannt. Lediglich Euroimmun räumt mögliche Kreuzreaktivitäten seiner ELISAs zur Bestimmung von Antikörpern gegen Influenza A bzw. B ein. In einer von der Arbeitsgruppe um Sauerbrei [2012] durchgeführten Voruntersuchung an definierten Seren von Kindern von 2-5 Jahren sowie Schwangeren und deren Neugeborenen wurde der Euroimmun IVB-ELISA auf Kreuzreaktivität mit IVA getestet. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Kreuzreaktivität bzw. Spezifität der eingesetzten ELISAs nur begrenzt einschätzen ließ, da keine definierten Standardseren zur Verfügung standen. Gegen eine Kreuzreaktivität aller IVB-ELISAs spricht jedoch, dass ein hoher Anteil der IVA-IgG-positiven Seren nicht in den IVB-ELISAs reagierte. Ein weiteres Indiz dafür, ob möglicherweise die Tests für IVA und IVB gegen Influenza B- bzw. Influenza A-Antikörper kreuzreaktiv sind, wäre deren Korrelation miteinander. Dabei ergab sich für den Vergleich des IVA- mit dem IVB-ELISA der Firma Euroimmun ein Kappa-Koeffizient von 0.521. Dies entspricht einer mittelmäßigen Übereinstimmung und könnte für eine mögliche Kreuzreaktivität sprechen. Die Vergleiche der IVA- mit den IVB-ELISAs der Firmen NovaTec und IBL ergaben Kappa-Koeffizienten  $\leq 0.2$ . Dies entspricht einer geringen Übereinstimmung (NovaTec: 0.035; IBL: 0.139) und spricht für keine oder nur sehr geringe Kreuzreaktivitäten. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass ein nicht geringer Anteil an Probanden auch Doppelinfektionen mit IVA und IVB aufweist.

### **Einfluss der Impfung auf die Prävalenzergebnisse**

Insgesamt enthielten 83,84% (1.396/1.664) der Kinderseren Informationen zum Impfstatus gegen die saisonale und pandemische Influenza (Schweinegrippe) und wurden zwischen April und August 2010, also der Spätphase der pandemischen Influenza, entnommen. Diese 1.396 Proben wurden in zwei Gruppen (Geimpft / Nicht-Geimpft) geteilt und hinsichtlich der Seroprävalenz miteinander verglichen. Gegen die

saisonale Influenza waren 15,76% (220/1.396) der Probanden und gegen die pandemische Influenza 7,1% (99/1.396) geimpft. Für die Influenzaschutzimpfungen werden Spalt- oder Subunit Impfstoffe verwendet, die die gereinigten Oberflächenantigene HA und NA enthalten [FachInfo-Service. 2013]. Zur saisonalen Impfung gehören meist die drei Typen A/H3N2, A/H1N1 und B. Der pandemische Impfstoff enthielt für die Saison 2009/2010 A/H1N1/Caliifornia/7/2009. Kinder und Jugendliche, die gegen die saisonale Influenza geimpft wurden, wiesen signifikant höhere Seroprävalenzen in allen drei ELISAs auf als Ungeimpfte, sowohl für IVA als auch für IVB. Auch die Gruppe der gegen die pandemische Influenza geimpften Kinder und Jugendlichen wies signifikant höhere Antikörperprävalenzen in allen drei IVA-ELISAs auf (Abschnitt 5.5). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Assays auch IgG-Antikörper detektieren, die durch die saisonale und pandemische Influenzaschutzimpfung induziert wurden. Demgegenüber steht die Aussage, dass die ELISAs eigentlich subtypen- und linien-unabhängig IVA- und IVB-spezifischen Antikörper gegen MP und NP nachweisen, die genetisch hoch konserviert sind. Eine Detektion von Impfantikörpern, die gegen HA und NA als Antigene gerichtet sind, sollte daher nicht bevorzugt auftreten. Da jedoch in den verwendeten ELISAs von Euroimmun und IBL Gesamtprotein mit einem hohen Anteil an MP und NP als Antigene verwendet wurde, ist eine Detektion von Impfantikörpern prinzipiell möglich. Dies betrifft mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf die ELISAs von NovaTec zu, obwohl laut Herstellerangaben gereinigte MP und NP als Antigen dienen. Weitere Untersuchungen wären hier nötig, um genauere Aussagen treffen zu können. Da der Anteil der Geimpften sehr gering war und die Impfrate mit 15-20% in der erwachsenen Kontrollgruppe ebenfalls als gering eingestuft werden kann [Böhmer et al. 2012], war der Einfluss der Impfung auf die Seroprävalenz von untergeordneter Bedeutung.

## **6.2 Seroprävalenzergebnisse der Influenza A und B**

Ausgehend von den vorliegenden und den bereits publizierten Ergebnissen zu seroepidemiologischen Untersuchungen über IVA und IVB [Bodewes et al. 2011, Schmidt-Ott et al. 2007] sowie Analysen zu Sensitivität und Kreuzreaktivität der eingesetzten Teste [Sauerbrei. 2012] wurden für die Dokumentation der IVA-Seroprävalenz der IVA-IgG-ELISA von IBL und für die Bestimmung der IVB-Seroprävalenz der IVB-IgG-ELISA von Euroimmun verwendet. Alle Aussagen in der nachfolgenden Diskussion und auch in den Schlussfolgerungen beruhen auf den

Ergebnissen dieser beiden Assays, die im Vorfeld mittels der Testung definierter Serumproben von Kindern, Neugeborenen und deren Mütter und mit dem HAHT validiert wurden. Dabei erreichten beide ELISAs eine diagnostische Sensitivität von  $\geq 97\%$  [Sauerbrei. 2012].

Die Abbildungen 48 und 49 stellen die Seroprävalenzen und Konzentrationen IVA- und IVB-spezifischer IgG-Antikörper, nach Geschlechtern getrennt, grafisch dar.

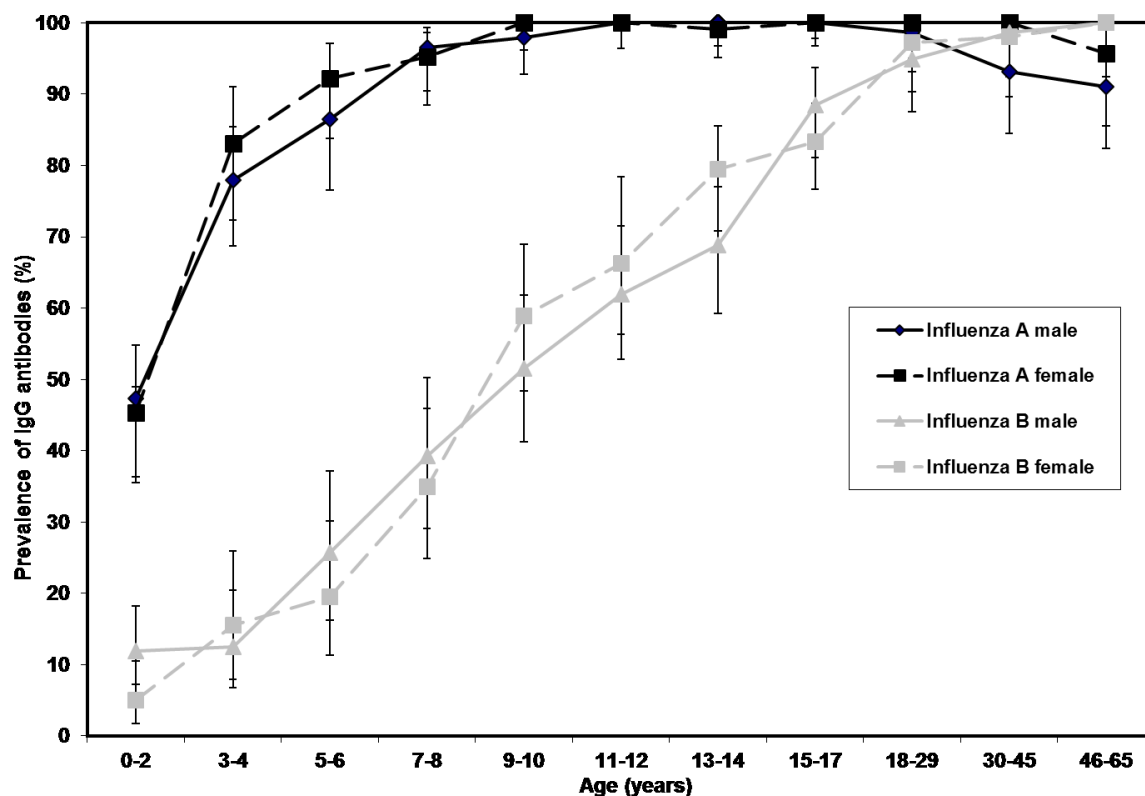


Abb. 48: IVA- und IVB-spezifische IgG-Antikörperprävalenzen mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen über alle Altersgruppen, nach Geschlecht getrennt [Sauerbrei et al. 2014].



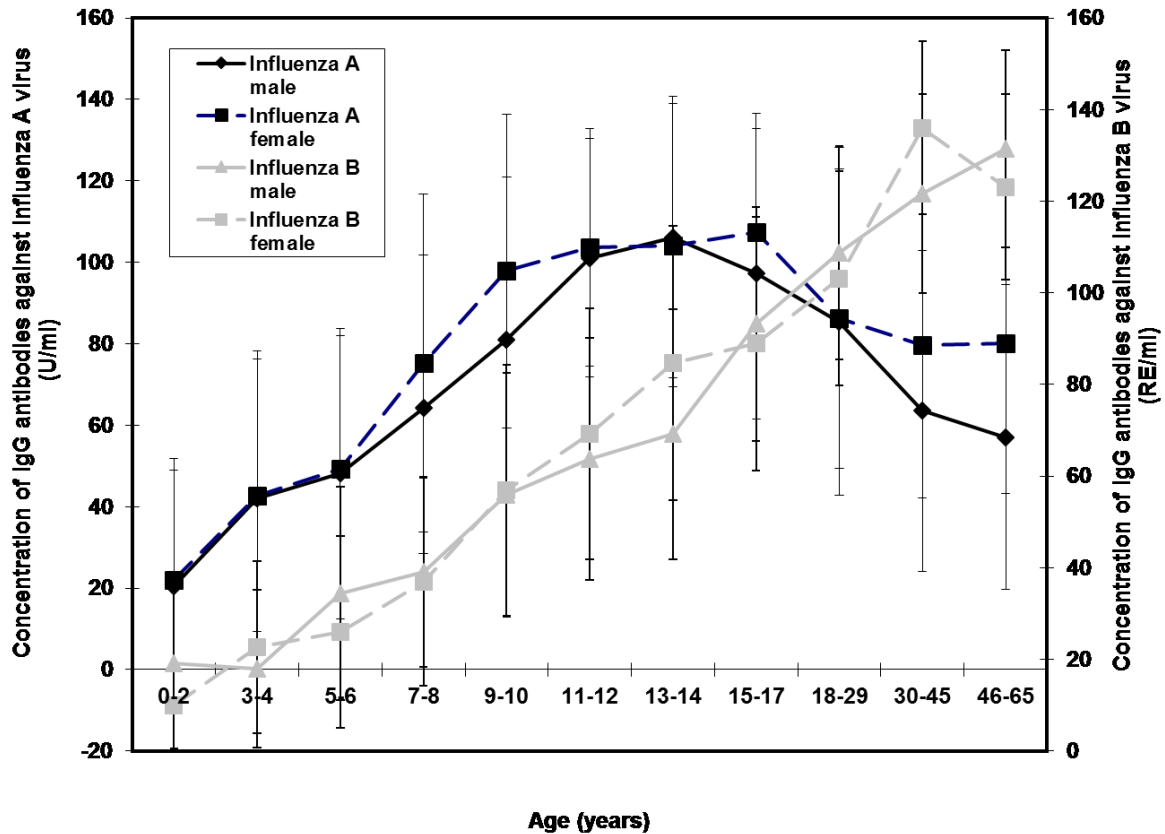


Abb. 49: IVA- und IVB-spezifische IgG-Antikörperkonzentrationen mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen über alle Altersgruppen, nach Geschlecht getrennt [Sauerbrei et al. 2014].

## Influenza A

Die Gesamtseroprävalenz für Influenza A betrug 87,6% [85,9%; 89,2%] innerhalb der Studiengruppe der Kinder und Jugendlichen und 96,3% [93,9%; 97,9%] bei der Erwachsenen-Kontrollgruppe. In der Studiengruppe stieg die Seroprävalenz signifikant mit dem Alter ( $p < 0.001$ ) an, während in der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der Seroprävalenz mit dem Alter festgestellt wurde ( $p = 0.004$ ). Es konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Seroprävalenz in der Studiengruppe festgestellt werden ( $p = 0.576$ ). In der Kontrollgruppe war die Prävalenz bei Frauen signifikant höher als bei Männern ( $p = 0.031$ ). Kinder im Alter von 0-6 Jahren hatten eine signifikant niedrigere ( $p < 0.050$ ) und Kinder im Alter von 13-14 Jahren eine signifikant höhere ( $p < 0.037$ ) Seroprävalenz als die Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen. Im Altersbereich von 7-12 Jahren und 15-17 Jahren unterschieden sich die IVA-Prävalenzen statistisch nicht wesentlich von der Kontrollgruppe ( $p > 0.050$ ). Die mittlere Antikörperkonzentration lag in der

Studiengruppe bei 59,95 U/ml, in der Kontrollgruppe bei 72,02 U/ml und über alle Altersgruppen bei 62,07 U/ml. Die Konzentration stieg signifikant bis zum Alter von 17 Jahren ( $p < 0.001$ ), um dann im Erwachsenenalter wieder abzufallen ( $p = 0.041$ ). Geschlechtsunterschiede konnten in Studien- und Kontrollgruppe nicht festgestellt werden ( $p = 0.426$  und  $p = 0.300$ ). Die mittlere Antikörperkonzentration war im Alter von 0-6 Jahren signifikant niedriger ( $p < 0.001$ ) und im Alter von 11-17 Jahren signifikant höher als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Die Gesamtseroprävalenz über alle Altersgruppen hinweg betrug 89,3% [87,9%; 90,6%].

Die Gesamtseroprävalenz von 87,6% bei Kindern und Jugendlichen spiegelt die epidemiologische Dominanz der saisonalen und pandemischen Influenza A gegenüber der Influenza B von 2008 bis 2010, dem Zeitraum der Probenentnahmen wider [Arbeitsgemeinschaft Influenza. 2008 und 2009, Robert Koch-Institut. 2010]. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass Antikörper mindestens bis 6 Monate nach Infektion oder Impfung persistieren [Ott et al. 2012]. Die Seroprävalenz zeigte eine altersabhängige Zunahme bis zu einem Alter von 9-10 Jahren, ab dem nahezu alle Kinder und Jugendlichen Antikörper gegen Influenza A entwickelt hatten. Diese Daten korrelieren sehr gut mit Ergebnissen, die eine Studie aus den Niederlanden erbracht hat [Bodewes et al. 2011]. Diese Untersuchung, die mit dem HAHT durchgeführt wurde, zeigte, dass alle Kinder ab einem Alter von 7 Jahren Antikörper gegen mindestens einen der für die serologische Studie ausgewählten repräsentativen H3N2- bzw. H1N1-Stämme gebildet hatten. Die hier vorliegenden Daten zeigen, dass Kinder ab einem Alter von 9 Jahren eine gute Grundimmunität gegen Influenza A besitzen. Somit haben diese ein geringeres Risiko, an einer schwer verlaufenden Erstinfektion der Influenza zu erkranken und benötigen deshalb keine zweite Impfdosis bei einer erstmaligen saisonalen Influenzaschutzimpfung [Sauerbrei et al. 2014]. Dies ist in Übereinstimmung mit den zuvor veröffentlichten Ergebnissen einer Studie, die die Immunogenität und Wirksamkeit von trivalenten Spalt-Impfstoffen gegen die saisonale Influenza bei ungeimpften Kindern im Alter von 6-9 und 10-13 Jahren untersucht hat [Schmitt-Ott et al. 2007]. Im Gegensatz zu den hohen Prävalenzen bei älteren Kindern sind etwa 40% der Kinder im Alter von 0-4 Jahren seronegativ. Diese sind demzufolge immunologisch naiv und werden deshalb als potenziell anfällig für schwere Erstinfektionen mit Influenza A angesehen.

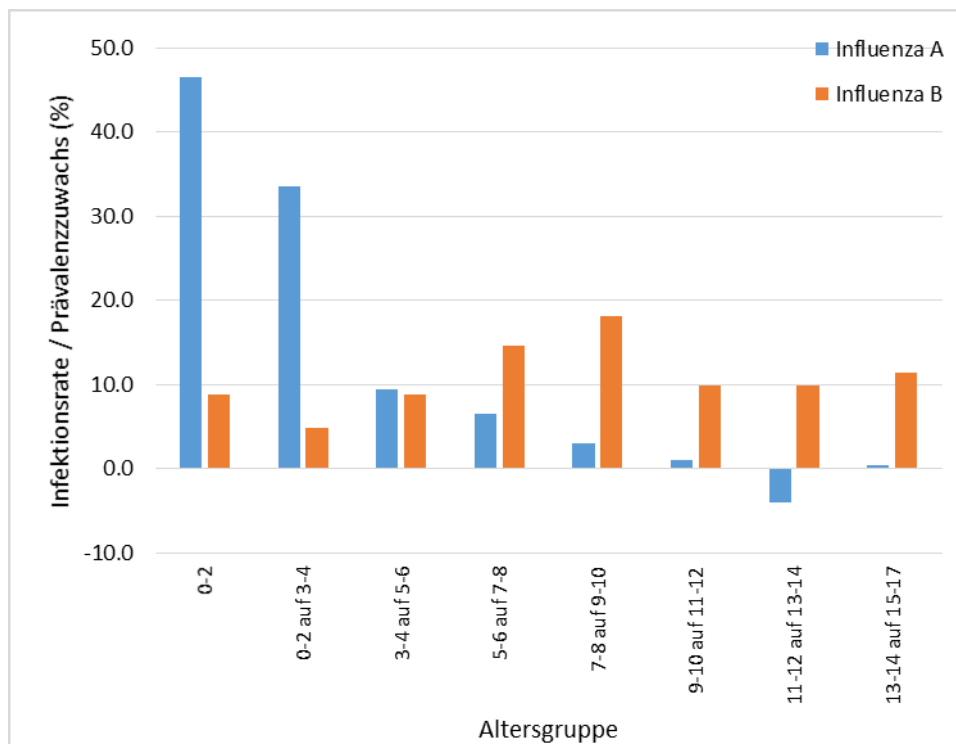


Abb. 50: Errechnete Infektionsraten für IVA und IVB von einer Altersgruppe zur nächsten mit steigendem Alter.

Diese beschriebene Situation wird auch in Abb. 50 deutlich, die die errechneten Infektionsraten darstellt. Diese wurden aus dem prozentualen Prävalenzzuwachs von einer Altersgruppe zur nächstälteren Altersgruppe errechnet. Dabei wurde deutlich, dass im Kleinkindalter (0-4 Jahre) die höchsten Infektionsraten (etwa 35%) auftreten, um mit zunehmendem Alter stetig abzunehmen. Diese Daten korrelieren dabei sehr gut mit denen von Bodewes et al., die die höchsten Infektionsraten im Alter von 2 bis 3 Jahren fanden [Bodewes et al. 2011]. Die Serokonversion für IVA findet somit schon sehr früh im Kleinkindalter im Alter von 3-4 Jahren statt. Darüber hinaus hatten in der aktuellen Studie Kinder bis zum Alter von 6 Jahren eine signifikant niedrigere IVA-IgG-Antikörperprävalenz und signifikant niedrigere IVA-IgG-Antikörperkonzentration als Erwachsene. Dies ist wahrscheinlich auf die geringere Anzahl von durchgemachten Reinfektionen mit IVA zurückzuführen [Sauerbrei et al. 2009]. Jugendliche im Alter von 13-14 Jahren hatten signifikant höhere IVA-Seroprävalenzen, und Kinder sowie Jugendliche im Alter von 11-17 Jahren hatten signifikant höhere IVA-Antikörperkonzentrationen als Erwachsene. Diese Ergebnisse, die in etwa den bereits publizierten Daten von 2009 entsprechen [Sauerbrei et al. 2009], deuten darauf hin, dass diese Altersgruppen die höchsten Raten von IVA-Reinfektionen aufweisen, die mitunter völlig asymptomatisch verlaufen können [Robert Koch-Institut. 2011]. Die im

Erwachsenenalter wieder geringfügig fallende Seroprävalenz könnte durch eine mit zunehmendem Alter schneller schwindende Immunität bedingt sein [Weinke. 2012]. In der erwachsenen Kontrollgruppe war die IVA-IgG-Antikörperprävalenz zudem bei Frauen signifikant höher als bei Männern. Ursache dafür könnte sein, dass meist Frauen in Kinderbetreuungseinrichtungen arbeiten [JoomBee. 2008] und dementsprechend mit Kindern in Kontakt kommen, die nachweislich die höchste Inzidenz von Influenza A-Infektionen besitzen.

### **Influenza B**

Die Gesamtseroprävalenz für Influenza B betrug 47% [44,6%; 49,5%] innerhalb der Studiengruppe und 98% [96,1%; 99,1%] bei den Kontrollprobanden. Sowohl in der Studien- als auch der Kontrollgruppe stieg die Seroprävalenz signifikant mit dem Alter an ( $p < 0.001$  und  $p = 0.018$ ). Es konnten keine signifikanten Geschlechtsunterschiede hinsichtlich der Seroprävalenz in der Studien- und Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p = 0.977$  und  $p = 0.635$ ). Die Seroprävalenz war bei Kindern und Jugendlichen aller Altersgruppen signifikant niedriger als in der Gesamtpopulation der erwachsenen Kontrollen ( $p < 0.001$ ). Die mittlere Antikörperkonzentration lag in der Studiengruppe bei 54,67 RE/ml, in der Kontrollgruppe bei 119,31 RE/ml und über alle Altersgruppen bei 67,70 RE/ml. Die Konzentration stieg signifikant bis zum Alter von 17 Jahren ( $p < 0.001$ ), um dann im Erwachsenenalter konstant zu bleiben ( $p = 0.228$ ). Geschlechtsunterschiede konnten in Studien- und Kontrollgruppe nicht festgestellt werden ( $p = 0.317$  und  $p = 0.892$ ). Die mittlere Antikörperkonzentration war in der Studiengruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Die Gesamtseroprävalenz über alle Altersgruppen hinweg betrug 42,5% [40,4%; 44,7%].

Für Influenza B wurde eine signifikant niedrigere IgG-Antikörperprävalenz im Vergleich zu Influenza A festgestellt. Die Gesamtprävalenz betrug bei Kindern und Jugendlichen lediglich 47%. Etwa 67% der Kinder bis zu einem Alter von 12 Jahren erwiesen sich als seronegativ und dementsprechend anfällig für eine schwere Influenza B-Erstinfektion. Erst ab einem Alter von 18 Jahren wurde eine Seroprävalenz von über 90% erreicht. Die deutlich niedrigeren Prävalenzergebnisse der Vorgänger-Studie von 2009, in der die IVB-Gesamtprävalenz bei Kindern und Jugendlichen mit 9,6% [Sauerbrei et al. 2009] fast 40% weniger betrug als in der aktuellen Studie, lässt sich durch die regional sehr begrenzte Studienpopulation und den Einsatz eines anderen

kommerziellen IVB-IgG-ELISAs (Firma NovaTec) erklären. Der 2009 verwendete IVB-ELISA der Firma NovaTec erreichte in der aktuellen Evaluation gegenüber dem in dieser Studie verwendeten IVB-ELISA der Firma Euroimmun hinsichtlich seiner Sensitivität zur Detektion IVB-spezifischer IgG-Antikörper signifikant schlechtere Ergebnisse. Auch zirkuliert IVB regional mit unterschiedlicher Stärke, was im Folgenden noch näher dargestellt wird. Abbildung 50 (Seite 100) stellt die errechneten Infektionsraten dar, berechnet durch den prozentualen Prävalenzzuwachs von einer Altersgruppe zur nächstälteren Altersgruppe. Dabei wurde deutlich, dass bei der Influenza B im Gegensatz zur Influenza A die höchsten Infektionsraten mit 15-20% im Grundschulalter von 6 bis 10 Jahren auftreten. In allen anderen Altersstufen im Kindes- und Jugendalter lagen die Infektionsraten unter 10%. Es ist von einer gesteigerten Serokonversion für Influenza B ab einem Alter von 6 Jahren auszugehen. Erst im Alter von 18 Jahren wurden Prävalenzraten ähnlich derer bei Influenza A erreicht. Diese Daten korrelieren dabei weniger gut mit denen von Bodewes et al., die die höchsten Infektionsraten von etwa 20% im Alter von 3 und 5 Jahren fanden [Bodewes et al. 2011], also etwas früher als in der vorliegenden Studie. Auch waren 72% der Probanden im Alter von 7 Jahren gegenüber mindestens einen IVB-Stamm seropositiv [Bodewes et al. 2011]. Demgegenüber steht eine IVB-Seroprävalenz von 37,1% bei Kindern im Alter von 7-8 Jahren in der aktuellen Studie, was durchaus für die regionale Begrenztheit und unterschiedliche Stärke der Zirkulation der Influenza B spricht. Die in der Studie von Schmidt-Ott publizierten Seropositivitäten von 37,1% bei Kindern im Alter von 6-9 Jahren und 66% bei Kindern im Alter von 10-13 Jahren [Schmidt-Ott et al. 2007] korrelieren gut mit den Resultaten der aktuellen Studie. Dort waren 37,1% der Kinder im Alter von 7-8 Jahren und 64,2% der Kinder im Alter von 11-12 Jahren seropositiv.

In der vorliegenden Studie waren sowohl die IVB-Antikörperprävalenzen als auch die IVB-Antikörperkonzentrationen in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe der Erwachsenen. Einerseits scheinen Kinder und Jugendliche weniger häufig infiziert zu werden als im Erwachsenenalter [Sauerbrei et al. 2009]. Andererseits können die Ergebnisse dafür sprechen, dass deutlich mehr Reinfektionen mit Boostereffekt nötig sind, um eine ausreichende Grundimmunität gegen IVB zu erreichen. Aus den aktuellen Ergebnissen kann also geschlossen werden, dass die Ausbildung einer ausreichenden natürlichen Grundimmunität gegen IVB, vergleichbar mit der gegen IVA, erst im Alter von 18 Jahren erreicht wird. Da

Kinder mit einer unvollständigen natürlichen IVB-spezifischen Immunität ein höheres Risiko für eine IVB-Infektion mit schwerem klinischem Verlauf haben [Troendle et al. 1992, Munoz. 2003], könnte eine allgemeine saisonale Influenza-B-Schutzimpfung für alle Kinder von Nutzen sein.

In Deutschland gibt es offensichtlich regionale Unterschiede hinsichtlich der Seroprävalenz von Influenza B. Wie die aktuelle Studie zeigt, unterschieden sich die IVB-Seroprävalenzen von verschiedenen deutschen Regionen, die bei einem Durchschnittsalter von 8-10 Jahren zwischen 35% und 65% lagen (Tab. 55, Abb. 51). Im Gegensatz dazu variierten die IVA-Seroprävalenzen nur um etwa 16% (82%-98%). Dies bedeutet, dass Ausbrüche der Influenza B im Vergleich zu Influenza A-Epidemien oft regional begrenzt verlaufen. Dazu sind jedoch multizentrische Studien nötig, um repräsentative Seroprävalenzdaten für Influenza B zu erhalten. Möglicherweise könnten auch unterschiedliche regionale Impfraten gegen die saisonale Influenza zu diesen großen Differenzen der IVB-Prävalenzen in den einzelnen Regionen geführt haben. Zu genauen Impfdaten in einzelnen Bundesländern der Bundesrepublik Deutschland gibt es aktuell jedoch keine Daten in der Literatur. Interessanterweise wurde die niedrigste IVB-Seroprävalenz dieser Studie mit 25,9% bei Kindern und Jugendlichen aus dem thüringischen Raum beobachtet, deren Proben von der Kinderklinik in Erfurt rekrutiert wurden und ein Durchschnittsalter von 6 Jahren aufwiesen. Dieser Punkt ist vereinbar mit den ebenfalls sehr geringen Prävalenzzahlen für IVB von 9,6% in der Vorgängerstudie [Sauerbrei et al. 2009].

Tab. 55: Seroprävalenzen in Abhängigkeit von der Herkunft der Proben. n=Anzahl der Proben.

Region (n)	Durchschnittsalter [95% CI]	Seroprävalenz IVA (%)	Seroprävalenz IVB (%)
Berlin (85)	8,45 [7,47-9,43]	90,6	52,9
Bremen (268)	8,25 [7,64-8,86]	81,7	34,7
Erfurt (108)	5,80 [4,86-6,73]	75,7	25,9
Krefeld (111)	11,22 [10,54-11,89]	98,2	49,5
Mannheim (225)	8,38 [7,72-9,04]	89,3	46,9
München (84)	9,14 [8,04-10,24]	89,3	50,0
Ulm (278)	8,23 [7,56-8,91]	81,8	52,0
Wuppertal (366)	9,59 [9,10-10,08]	90,7	48,4
Würzburg (140)	9,94 [9,17-10,70]	97,9	64,3
Gesamt		87,6	47,0

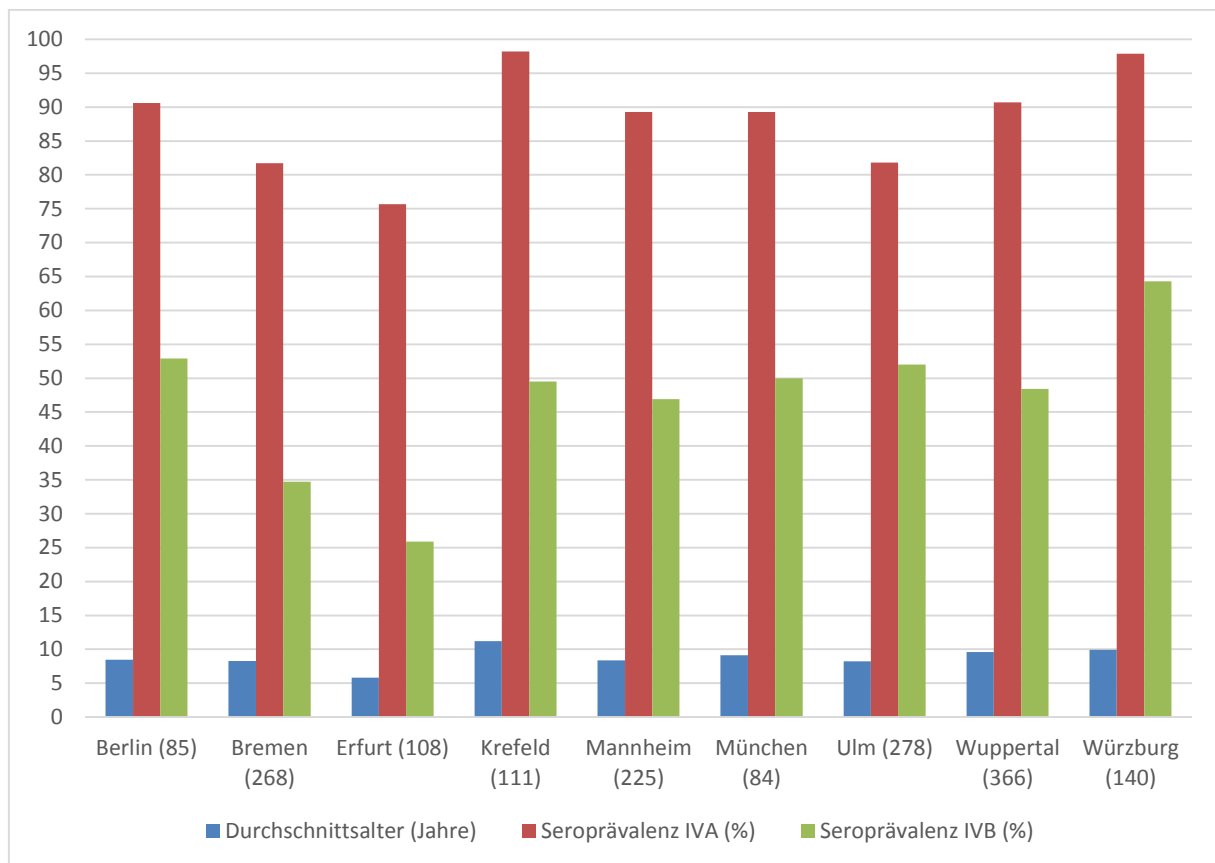


Abb. 51: Seroprävalenzen in Abhängigkeit von der Herkunft der Proben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die kommerziellen IVA- und IVB-IgG-ELISAs der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL hinsichtlich ihrer Methodik (Antigene, Testdurchführung und -auswertung) nicht wesentlich unterscheiden. Dennoch bestehen erhebliche Unterschiede in ihrer Sensitivität zur Detektion IVA- und IVB-spezifischer IgG-Antikörper, was zu erheblichen Differenzen in den Seroprävalenzergebnissen der einzelnen ELISAs führt. Weiterhin ist festzuhalten, dass sich die Spezifität bzw. Kreuzreaktivität der eingesetzten ELISAs nur begrenzt einschätzen ließ, da keine einheitlichen Standardseren zur Verfügung standen. Dennoch ist das Hauptproblem kommerziell vertriebener ELISAs zur Bestimmung der IVA-/IVB-Seroprävalenz in der reduzierten Sensitivität und weniger in einer mangelnden Spezifität zu suchen. Es ist zu empfehlen, IVA- und IVB-IgG-ELISAs vor ihrem Einsatz einer Evaluierung und Validierung zu unterziehen. Die ermittelten Seroprävalenzdaten mit dem IVA-IgG-ELISA von IBL und dem IVB-IgG-ELISA von Euroimmun ermöglichen Schlussfolgerungen für die Durchführung der Influenzaschutzimpfung im Kindesalter.

## 7 Schlussfolgerungen

1. Die Influenza gilt als eine der größten Bedrohungen der öffentlichen Gesundheit mit jährlich über einer Milliarde Infizierter weltweit. Durch die hohe genetische Variabilität des Influenzavirus A (IVA) infolge Antigendrift und -shift kann es jederzeit zu epidemischen oder pandemischen Ausbrüchen beim Menschen kommen.
2. Die Influenzaschutzimpfung stellt die wirksamste und kosteneffektivste Prophylaxe gegen die Influenza dar und schützt vor einer Infektion und deren Komplikationen.
3. Bislang gibt es nur wenige epidemiologische Studien zur Seroprävalenz der Influenza bei Kindern und Jugendlichen weltweit und insbesondere für Deutschland. Diese können jedoch Rückschlüsse über Häufigkeit und Verteilung der Erkrankung in den verschiedenen Altersgruppen geben.
4. Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) mit einem hohen Anteil Influenzavirus A (IVA)- und Influenzavirus B (IVB)-spezifischen Ribonukleoprotein (RNP)- und Matrixprotein (MP)-Antigenen stellen sensitive und kostengünstige Methoden zur Detektion subtypen- und linienunabhängiger IgG-Antikörper gegen IVA und IVB und damit für große Seroprävalenzstudien dar.
5. Die kommerziellen IVA- und IVB-IgG-ELISAs der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL zeigen erhebliche Differenzen hinsichtlich der Sensitivität und der ermittelten Seroprävalenzraten.
6. Die geprüften kommerziellen IVA- und IVB-IgG-ELISAs weisen nur eine geringe Korrelation untereinander auf. Lediglich die IVB-ELISAs der Firmen Euroimmun und IBL zeigten eine gute Übereinstimmung. Entsprechende Teste sollten deshalb vor dem Einsatz zur Bestimmung der Seroprävalenz evaluiert werden.
7. Die Influenza-Seroprävalenzen der Kinder und Jugendlichen, die zeitnah eine Influenzaschutzimpfung erhielten, waren signifikant höher als die der Ungeimpften. Dies spricht dafür, dass die eingesetzten ELISAs der Firmen NovaTec, Euroimmun und IBL Influenza-spezifische Antikörper, induziert durch Impfung, erfassen.
8. Der IVA-IgG-ELISA von IBL sowie der IVB-IgG-ELISA von Euroimmun eignen sich am besten für die Bestimmung der Seroprävalenz von Influenza A und B.
9. Die Prävalenz von IVA-spezifischen IgG-Antikörpern steigt im Kindes- und Jugendalter stufenweise an.



10. Bei ca. 40% aller Kleinkinder bis zum 4. Lebensjahr sind keine Antikörper gegen IVA nachweisbar. Diese Kinder sind demzufolge immunnaiv und deshalb durch schwere IVA-Erstinfektionen bedroht.
11. Ab dem 9. Lebensjahr beträgt die IVA-Seroprävalenz über 95%. Damit besteht bei diesen Kindern eine gute Basisimmunität und dadurch wahrscheinlich ein geringeres Risiko für schwere IVA-Infektionen.
12. Die Prävalenz von IVB-spezifischen IgG-Antikörpern steigt im Kindes- und Jugendalter ebenfalls stufenweise an, jedoch deutlich verzögert im Vergleich zur IVA-Seroprävalenz. Bis zu einem Alter von 18 Jahren wird eine IVB-Seroprävalenz von 90%, vergleichbar der Influenza A, erreicht.
13. In Deutschland bestehen nur geringe regionale Unterschiede in der IVA-Seroprävalenz, während sich für IVB ausgeprägte Unterschiede feststellen lassen. Dies spricht dafür, dass IVB regional begrenzt und in unterschiedlichem Maße zirkuliert.
14. Die Einführung einer jährlichen Influenzaschutzimpfung bei Kindern und Jugendlichen könnte den Schutz vor schweren Verläufen und Komplikationen bei Erstinfektionen mit Influenza im Rahmen epidemischer Ausbrüche in diesen Altersgruppen wesentlich verbessern.

## 8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Abe M et al. 2007. Effects of several virucidal agents on inactivation of influenza, Newcastle disease, and avian infectious bronchitis viruses in the allantoic fluid of chicken eggs. *Jpn J Infect Dis.* 60 (6): 342-6.
2. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases (ACIP). 2002. Reduction of the burden of influenza in children – Policy Statement. *Pediatrics.* 110: 1246-1252.
3. Adams JS und Hewison M. 2008. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4(2): 80–90.
4. Adinolfi M and Lessof MH. 1972. Development of humoral and cellular immunity in man. *J Med Genet.* 9(1): 86-91.]
5. Allwinn R et al. 2002. Laboratory diagnosis of influenza--virology or serology? *Med Microbiol Immunol.* 191: 157-160. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=12458351>.
6. Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI). 1997-2002. Abschlussberichte der Influenzasaison 1996/1997 bis 2001/2002.  
Link: <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>.
7. Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI). 2003-2009. Abschlussberichte der Influenzasaison 2002/2003 bis 2008/2009. Unter Federführung des RKI.  
Link: <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>.
8. Armitage P. 1955. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics (International Biometric Society).* 11(3): 375–386.
9. Ben-Hur H et al. 2005. Transport of maternal immunoglobulins through the human placental barrier in normal pregnancy and during inflammation. *Int J Mol Med.* 16(3): 401-407.
10. Beyer WE et al. 1986. Immunoglobulin G, A and M response to influenza vaccination in different age groups: effects of priming and boosting. *J Hyg (Lond).* 96(3): 513-522.
11. Billington WD. 1992. The normal fetomaternal immune relationship. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 6(3): 417-438.

12. Bishai FR and Galli R. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. *J Clin Microbiol.* 8: 648-656. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=217892>.
13. Black S et al. 2011. Hemagglutination inhibition antibody titers as a correlate of protection for inactivated influenza vaccines in children. *Pediatr Infect Dis J.* 30(12): 1081-1085.
14. Bodewes R et al. 2011. Prevalence of antibodies against seasonal influenza A and B viruses in children in Netherlands. *Clin Vaccine Immunol.* 18:469-76.
15. Böhmer MM et al. 2012. Barriers to pandemic influenza vaccination and uptake of seasonal influenza vaccine in the post-pandemic season in Germany. *BMC Public Health.* 31: 938.
16. Brandstädt A, Dietrich C. 2012. Retrospektive Bestimmung der Prävalenz Influenza A- und B-spezifischer IgG-Antikörper bei Kindern und Jugendlichen [Biometrischer Abschlussbericht]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität. Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation.
17. Butler D. 2007. Cheaper approaches to flu divide researchers. *Nature.* 448: 976–977.
18. Cannell JJ et al. 2008. On the epidemiology of influenza. *Virology Journal.* 5 (29).
19. Centers for Disease Control (CDC). 2005. Prevention and Control of Influenza Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR.* 54(RR08): 1-40. Link: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5408a1.htm>
20. Cinatl J jr. et al. 2007. The threat of avian influenza A (H5N1). Part IV: development of vaccines. *Med Microbiol Immunol.* 196: 213–225.
21. Cochran WG. 1954. Some methods for strengthening the common chi-squared tests. *Biometrics (International Biometric Society).* 10(4): 417–451.
22. Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas.* 20: 37-46.
23. Corbel L. 2007. Should healthy children be vaccinated against influenza? Comments about this query. *Eur J Pediatr.* 166: 629-631.
24. DiazGranados CA et al. 2012. Seasonal influenza vaccine efficacy and its determinants in children and non-elderly adults: a systematic review with meta-analyses of controlled trials. *Vaccine.* 31: 49-57.

25. Dörner et al. 2009. Klinisch - chemische Analytik. In: Dörner et al. Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie. 7te Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG.
26. Dunnett CW. 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. J Am Stat Assoc. 50: 1096–1121.
27. Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA). 2012. Fluenz. Influenza-Impfstoff. Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit. European Medicines Agency. Link: [http://www.ema.europa.eu/docs/de\\_DE/document\\_library/EPAR-Summary\\_for\\_the\\_public/human/001101/WC500103712.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR-Summary_for_the_public/human/001101/WC500103712.pdf)
28. Engle RF. 1983. Wald, Likelihood Ratio, and Lagrange Multiplier Tests in Econometrics. Handbook of Econometrics II. Elsevier. 796–801.
29. Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG. 2011. Arbeitsanleitung. Link: <http://www.euroimmun.de>; Influenza A: EI\_2691G\_A\_DE\_C04.doc / Influenza B: EI\_2692G\_A\_DE\_C03.doc.
30. FachInfo-Service. 2013. VAXIGRIP® 2013/14. Link: <http://www.fachinfo.de/viewFI?FINR=013854&RL=VAXIGRIP%26reg%3B%20Injektionssuspension%20in%20einer%20Fertigspritze>.
31. Feldkamp J et al. 2004. Pschyrembel – Klinisches Wörterbuch. 260te Auflage. Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co.KG. S.475.
32. Frank AL et al. 1981. Patterns of shedding of myxoviruses and paramyxoviruses in children. J Infect Dis. 144: 433-41.
33. Gall SA. 2005. Maternal immunization to protect the mother and neonate. Expert Rev Vaccines. 4(6): 813-818.
34. Ginde AA et al. 2009. Association between Serum 25-Hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Arch Int Med. 169(4): 384–390.
35. Glezen WP et al. 1997. Influenza virus infections in infants. Pediatr Infect Dis J. 16: 1065-1068.
36. Grayson L et al. 2009. Efficacy of soap and water and alcohol-based hand-rub preparations against live H1N1 influenza virus on the hands of human volunteers. Clin Infect Dis. 48(3): 285-91.
37. Hale BG et al. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. J Gen Virol. 89(10): 2359-76.
38. Hall CB et al. 1979. Viral shedding patterns of children with influenza B infection. J Infect Dis. 140: 610-613.

39. Haye K et al. 2009. The NS1 protein of a human influenza virus inhibits type I interferon production and the induction of antiviral responses in primary human dendritic and respiratory epithelial cells. *J Virol.* 83(13): 6849-62.
40. Heikkinen T et al. 2004. Burden of influenza in children in the community. *J Infect Dis.* 190: 1369-73.
41. Heikkinen T et al. 2006. Should healthy children be vaccinated against influenza? A consensus report of the Summit of Independent European Vaccination Experts. *Eur J Pediatr.* 165: 223-228.
42. Heiny AT et al. 2007. Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS ONE.* 2(11): e1190.
43. Hite LK et al. 2007. Medically attended pediatric influenza during the resurgence of the Victoria lineage of Influenza B virus. *Int J Infect Dis.* 11: 40-47.
44. Hof S, Dörries R. 2009. Mikrobiologische Diagnostik. In: Hof S, Dörries R. *Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie.* 4te Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG. S.28-40.
45. Hof S, Dörries R. 2009. Orthomyxoviridae. In: Hof S, Dörries R. *Duale Reihe – Medizinische Mikrobiologie.* 4te Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag KG. S.218-219.
46. Hurwitz ES et al. 2000. Studies of the 1996-1997 inactivated influenza vaccine among children attending day care: Immunologic response, protection against infection, and clinical effectiveness. *J Infect Dis* 182: 1218-1221.
47. IBL International GmbH. 2012. Arbeitsanleitung. Link Influenza A: [http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE56511\\_IFU\\_de\\_Influenza\\_A\\_IgG\\_ELISA\\_V2012\\_08\\_sym3.pdf](http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE56511_IFU_de_Influenza_A_IgG_ELISA_V2012_08_sym3.pdf) ; Link Influenza B: [http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE56531\\_IFU\\_de\\_Influenza\\_B\\_IgA\\_ELISA\\_V2012\\_08\\_sym3.pdf](http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE56531_IFU_de_Influenza_B_IgA_ELISA_V2012_08_sym3.pdf).
48. Izurieta HS et al. 2000. Influenza and the rates of hospitalizations for respiratory disease among infants and young children. *N Engl J Med.* 342: 232-239.
49. Irving WL et al. 2000. Influenza virus infection in the second and third trimesters of pregnancy: a clinical and seroepidemiological study. *BJOG.* 107(10): 1282-1289.
50. JoomBee. Kindererziehung weiterhin Frauensache [Care of children is still the task of women (18 February 2010) English translation of the title]. [Accessed 15 May 2008]. German. Available from: <http://joombee.com/2010/02/18/kindererziehung-weiterhin-frauensache/>.

51. Julkunen I et al. 1984. Serological diagnosis of influenza A and B infections by enzyme immunoassay. Comparison with the complement fixation test. *J Virol Methods*. 9(1): 7-14.
52. Julkunen I et al. 1985. Enzyme immunoassay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests in the diagnosis of influenza A and B virus infections. Purified hemagglutinin in subtype-specific diagnosis. *J Virol Methods*. 10: 75-84. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=3882733>.
53. Kamps CS et al. 2006. Influenza Report 2006. Übersetzt von: Behrens D. 2007. Link: <http://www.InfluenzaReport.com>.
54. Klenk HD. Hrsg. 2010. Von: Doer HW et Gerlich WH. Medizinische Virologie. Zweite Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S.600-609.
55. König R et al. 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature*. 463: 813-817.
56. Lamb RA and Choppin PW. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Annu. Rev Biochem*. 52: 467–506.
57. Landis JR and Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159–174.
58. Lee BY and Shah M. 2012. Prevention of influenza in healthy children. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 10: 1139-52.
59. Leinikki P and Pässillä S. 1976. Solid phase antibody assay by means of enzyme conjugated to anti-immunoglobulin. *J Clin Pathol*. 29(12): 1116-1120.
60. Lindstrom SE. 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol*. 73(5): 4413-4426.
61. Londo DR et al. 1983. Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of influenza B virus. *J Virol*. 47(3): 642-648.
62. Longini IM et al. 2005. Containing pandemic influenza at the source. *Science*. 309: 1083-1087.
63. Martin K und Helenius A. 1991. Transport of incoming Influenza Virus Nucleocapsids into the Nucleus. *J Virol*. 56(1): 232.
64. Monto AS and Sullivan KM. 1993. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved. *Epidemiol Infect*. 110: 145-160.

65. Mossong J et al. 2008. Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med.* 5: e74.
66. Munoz FM. 2003. Influenza virus infection in infancy and early childhood. *Paediat Resp Rev.* 4: 99-104.
67. National Advisory Committee on Immunization (NACI). 2006. Statement on influenza vaccination for the 2006-2007 season. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep.* 32: 1-27.
68. Neuzil KM et al. 2000a. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. *J Pediatr.* 137: 856-64.
69. Neuzil KM et al. 2000b. The effect of influenza on hospitalizations, outpatient visits, and courses of antibiotics in children. *N Engl J Med.* 342: 225-31.
70. NovaTec Immundiagnostica GmbH. 2011. Produktbeilage / Arbeitsanleitung. Link Influenza A: [http://www.novatec-id.com/fileadmin/user\\_upload/Product\\_Insert/INFG0290engl\\_dt\\_fr\\_it\\_es\\_port-07042011.pdf](http://www.novatec-id.com/fileadmin/user_upload/Product_Insert/INFG0290engl_dt_fr_it_es_port-07042011.pdf); Link Influenza B: [http://www.novatec-id.com/fileadmin/user\\_upload/Product\\_Insert/INFG0300engl\\_dt\\_fr\\_it\\_es31082011.pdf](http://www.novatec-id.com/fileadmin/user_upload/Product_Insert/INFG0300engl_dt_fr_it_es31082011.pdf).
71. Ott U et al. 2012. Serological response to influenza A H1N1 vaccine (Pandemrix®) and seasonal influenza vaccine 2009/2010 in renal transplant recipients and in hemodialysis patients. *Med Microbiol Immunol.* 201(3): 297-302.
72. Palache A. 2009. Seasonal influenza vaccine provision in 157 countries (2004-2009) and the potential influence of national public health policies. *Vaccine.* 29: 9459-66.
73. Peltola V et al. 2002. Clinical courses of croup caused by influenza and parainfluenza viruses. *Pediatr Infect Dis J.* 21: 76-8. Link: <http://amedeo.com/lit.php?id=11791108>
74. Polozov IV et al. 2008. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nature Chemical Biology.* 4: 248-255.
75. Prince HE und Leber AL. 2003. Comparison of complement fixation and hemagglutination inhibition assays for detecting antibody responses following influenza virus vaccination. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10: 481-482. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=12738654>.
76. Principi N et al. 2004. Burden of influenza in healthy children and their households. *Arch Dis Child.* 89: 1002-1007.

77. Robb NC. 2009. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol.* 90(6): 1398-407.
78. Robert Koch-Institut. 2010-2013. Berichte zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2009/2010 bis 2012/2013.  
Link: <http://influenza.rki.de/Saisonbericht.aspx>
79. Robert Koch-Institut. 2000. Influenza – aktuelle Situation. *Epidemiol Bull.* 6: 49.
80. Robert Koch-Institut. 2010. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut / Stand 2010. *Epidemiol Bull.* 30: 279-297.
81. Robert Koch-Institut. 2011. RKI-Ratgeber für Ärzte: Influenza (Stand: Januar 2011).  
Link: [http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms\\_lv2=2961756&cms\\_box=1&cms\\_current=Influenza+%28Grippe%2C+Schw+eingrippe%29](http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/IPV/Influenza.html?cms_lv2=2961756&cms_box=1&cms_current=Influenza+%28Grippe%2C+Schw+eingrippe%29).
82. Robert Koch-Institut. 2013. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) Stand: August 2013. *Epidemiol Bull.* 34: 313-344.
83. Sachs L. Hrsg. 1984. Angewandte Statistik. 6. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag. S.258ff.
84. Saji F et al. 1999. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod.* 4(2): 81-89.
85. Sauerbrei A et al. 2009. Seroprevalence of influenza A and B in German infants and adolescents. *Med Microbiol Immunol.* 198: 93-101.
86. Sauerbrei A. 2012. Daten zur Seroprävalenz der Influenza bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland. 4. Deutscher Influenza-Kongress Erfurt (27.-29.September 2012). Vortrag.
87. Sauerbrei A et al. 2014. Prevalence of antibodies against influenza A and B viruses in children in Germany, 2008 to 2010. *Euro Surveill.* 19(5): pii=20867.  
Available online:  
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20687>.
88. Schaffer FL et al. 1976. Survival of airborne influenza virus: effects of propagating host, relative humidity, and composition of spray fluids. *Arch Virol.* 51: 263–273.
89. Schmidt-Ott R et al. 2007. Immunogenicity and reactogenicity of a trivalent influenza split vaccine in previously unvaccinated children aged 6-9 and 10-13 years. *Vaccine.* 26: 32-40.



90. Smith NM et al. 2006. Prevention and control of influenza: recommendations on the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 55: 1-42.
91. Steininger C et al. 2002. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol.* 40: 2051-2056. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=12037063>.
92. Streng A et al. 2011. Severe influenza cases in paediatric intensive care units in Germany during the pre-pandemic seasons 2005 to 2008. *BMC Infect Dis.* 11: 233.
93. Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull.* 28(3): 399-408.
94. Takizawa T et al. 2005. A novel Fc gamma R-defined, IgG-containing organelle in placental endothelium. *J Immunol.* 15; 175(4): 2331-2339.]
95. Tellier R. 2006. Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg Infect Dis.* 12(11): 1657-1662.
96. Tompkins SM et al. 2007. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg Infect Dis.* 13(3): 426-435.
97. Troendle JF et al. 1992. Fatal influenza virus B pneumonia in pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J.* 11: 117-121.
98. Tse M et al. 2012. Evaluation of three commercially available influenza A type-specific blocking enzyme-linked immunosorbent assays for seroepidemiological studies of influenza A virus infection in pigs. *Clin Vaccine Immunol.* 19(3): 334-7.
99. Urashima M et al. 2010. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren. *Am J Clin Nutr.* 91(5): 1255-1260.
100. US Food and Drug Administration: Office of In Vitro Diagnostic Device Evaluation and Safety (FDA). 2005. Cautions in Using Rapid Tests for Detecting Influenza A Viruses. Accessed December 15th 2005 at <http://www.fda.gov/cdrh/oivd/tips/rapidflu.html>.
101. van den Dungen FA et al. 2001. Fatal case of influenza B virus pneumonia in a preterm neonate. *Pediatr Infect Dis.* 20: 82-84.
102. von Kries R et al. 2011. Post-Pandemic Seroprevalence of Pandemic Influenza A (H1N1) 2009 Infection (Swine Flu) among Children <18 Years in Germany. *PLoS One.* 6(9): e23955.

103. Voeten JT et al. 1998. Use of recombinant nucleoproteins in enzyme-linked immunosorbent assays for detection of virus-specific immunoglobulin A (IgA) and IgG antibodies in influenza virus A- or B-infected patients. *J Clin Microbiol.* 36(12): 3527-3531.
104. Waalen K et al. 2012. Age-dependent prevalence of antibodies cross-reactive to the influenza A (H3N2) variant virus in sera collected in Norway in 2011. *Euro Surveill.* 17(19): pii=20170.
105. Watanabe S et al. 1999. Evaluation of an optical immunoassay test for a rapid detection of influenza A and B viral antigen. *Kansenshogaku Zasshi.* 73(12): 1199-1204.
106. Webster RG. 1968. The immune response to influenza virus. *Immunology.* 14(1): 29-37.
107. Weigl JA et al. 2002. The incidence of influenza-associated hospitalization in children in Germany. *Epidemiol Infect.* 129: 525-533.
108. Weinberg A et al. 2005. Sensitivity of diagnostic tests for influenza varies with the circulating strains. *J Clin Virol.* 33: 172-175. Abstract: <http://amedeo.com/lit.php?id=15911434>.
109. Weinke T. 2012. Neue Impfstoffe für die ältere Generation – Influenza und Pneumokokken? 4. Deutscher Influenza-Kongress Erfurt (27.-29. September 2012). Vortrag.
110. WHO. 2005a. WHO recommendations on the use of rapid testing for influenza diagnosis. Accessed November 25, 2005, at [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza\\_web.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/RapidTestInfluenza_web.pdf).
111. WHO. 2005b. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Accessed November 28, 2005 at <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/whocdscsrnrcs20025rev.pdf>.
112. Wieching A et al. 2012. Clinical characteristics of pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Northern Bavaria, Germany. *BMC Res Notes.* 5: 304.
113. Wittes J and Wallenstein S. 1993. The Power of the Mantel-Haenszel Test. *Biometrics.* 49(4): 1077-87.

114. Wutzler P et al. 2009. Seroprevalence of influenza A and B in pregnant women and their offspring. *J Clin Virol.* 46(2): 161-4.
115. Yao L et al. 2008. Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. *FASEB J.* 22(3): 733-40.
116. Yeolekar LR et al. 2001. Seroepidemiology of influenza in Pune, India. *Indian J Med Res.* 114: 121-6.
117. Zentrale Ethikkommission bei der Bundesärztekammer. Die (Weiter-) Verwendung von menschlichen Körpermaterialien für Zwecke der medizinischen Forschung (2003) [The (further) use of human body samples for the purpose of medical research (2003) English translation of the title] Berlin: Zentrale Ethikkommission bei der Bundesärztekammer, Berlin. [Accessed 15 May 2008]. German. Available from: <http://www.zentrale-ethikkommission.de/page.asp?his=0.1.21>.
118. Zepp F. 2012. Grippeimpfung bei Kindern: benötigen wir spezielle Impfstoffe? 4. Deutscher Influenza-Kongress Erfurt (27.-29.September 2012). Vortrag.
119. Zhi-Yong Yang et al. 2007. Immunization by Avian H5 Influenza Hemagglutinin Mutants with Altered Receptor Binding Specificity. *Science.* 317(5837): 825-828.

## 9 Anhang

Tab. A1: Reagenzienübersicht der Kitsysteme von NovaTec für den IgG-Antikörpernachweis von IVA/IVB. Weiteres Zubehör: Abdeckfolie, Rahmenhalter, Arbeitsanleitung und Ergebnisblatt.

Reagenz	Beschreibung	Menge
Influenzavirus A - bzw. B -beschichtete Mikrotiterstreifen (Influenzavirus A/B- typische Matrix- und Ribonukleoproteine)	12 teilbare 8er Streifen (96 Kavitäten), beschichtet mit Influenzavirus A / B-Antigen; vakuumverschlossen in wiederverschließbarem Aluminiumbeutel	jeweils 1 Mikrotiter-Platte
IgG - Probenverdünnungspuffer	pH 7,2 +/- 0,2; gelb gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe	1 Flasche mit 100 ml Puffer
Stopplösung	0,2 mol/l; gebrauchsfertig, rote Verschluss-Kappe	1 Fläschchen mit 15 ml Schwefelsäure
Waschlösung (20x)	20-fach konzentrierter Puffer zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 +/- 0,2; weiße Verschlusskappe	1 Flasche mit 50 ml
Influenzavirus A / B-anti-IgG-Konjugat	Peroxidase-konjugierte AK gegen humanes IgG; blau gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe	1 Flasche mit 20 ml
TMB-Substratlösung	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin; farblos; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe	1 Flasche mit 15 ml
Influenzavirus A / B-IgG-Positivkontrolle	gelb gefärbt; gebrauchsfertig; rote Verschluss-Kappe	1 Fläschchen mit 2 ml
Influenzavirus A / B-IgG-Cut-off Kontrolle	gelb gefärbt; gebrauchsfertig; grüne Verschlusskappe	1 Fläschchen mit 3 ml
Influenzavirus A / B-IgG-Negativkontrolle	gelb gefärbt; gebrauchsfertig; blaue Verschlusskappe	1 Fläschchen mit 2 ml

Tab. A2 : Übersicht über erforderliche Materialien, Geräte und Hilfsmittel zur Arbeit mit den NovaTec-, Euroimmun- und IBL-ELISAs.

Geräte, Materialien und Hilfsmittel	Hersteller
TECAN Reader "SPECTRA FLUOR" Photometer mit 450 / 620 nm-Filtern	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim (D)
magellan (Software zum TECAN Reader)	TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim (D)
KELVITRON Brutschrank / Wärmeinkubator mit Thermostat	HERAEUS instruments, Hanau (D)
Inkubationswasserbad	GFL mbH, Burgwedel (D)
ELx50 Auto Strip Washer	BIO - TEK Instruments, Bad Friedrichshall (D)
Vortex-Mischer Genie 2 TM	Bender & Hobein AG, Zürich (CH)
Glasmessbecher à 1000 ml	Schott Jenaer Glas GmbH, Jena (D)
Reagenzienreservoir aus Plastik	-
Matrix 1,4 ml Blank tubes-round bottoms (Plastikröhrchen zur Probenverdünnung, unsteril)	THERMO scientific, Waltham (USA)
EPPENDORF Multipette plus (bis 1 ml pro Hub)	EPPENDORF AG, Hamburg (D)
Einmalspritzen für Multipette 5 ml	
EPPENDORF-Multipipetten mit Einmalspritzen (10, 100, 200, 1000 µl)	
EPPENDORF Mehrkanalpipette (8er) 100 µl	
steriles Aqua destillata	-
Ethanol 96%, vergällt	-

Tab. A3: Reagenzienübersicht der Kitsysteme von Euroimmun. Weiteres Zubehör: Abdeckfolie und Rahmenhalter.

Bezeichnung	Beschreibung	Farbe	Format
<b>Antigen-beschichtete Reagenz-Gefäße</b> (Influenza A/B-typ-spezifische Vollantigene)	12 Mikrotiterstreifen zu je 8 ver-einzelbaren Reagenzgefäßen im Rahmen; gebrauchsfertig	...	12 x 8
<b>Kalibrator 1</b> (humanes Influenza-Virus A/B-IgG)	200 RE/ml; gebrauchsfertig	dunkelrot	1 x 2,0 ml
<b>Kalibrator 2</b> (humanes Influenza-Virus A/B-IgG)	20 RE/ml; gebrauchsfertig	rot	1 x 2,0 ml
<b>Kalibrator 3</b> (humanes Influenza-Virus A/B-IgG)	2 RE/ml; gebrauchsfertig	hellrot	1 x 2,0 ml
<b>Positive Kontrolle</b> (humanes Influenzavirus A/B-IgG)	Gebrauchsfertig	blau	1 x 2,0 ml
<b>Negative Kontrolle</b> (humanes Influenzavirus A/B-IgG)	Gebrauchsfertig	grün	1 x 2,0 ml
<b>Enzymkonjugat</b> Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG (Kaninchen)	Gebrauchsfertig	grün	1 x 12 ml
<b>Probenpuffer</b>	Gebrauchsfertig	hellblau	1 x 100 ml
<b>Waschpuffer</b> (10fach konzentriert)	Gebrauchsfertig	farblos	1 x 100 ml
<b>Chromogen / Substrat-Lösung</b>	TMB / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; gebrauchsfertig	farblos	1 x 12 ml
<b>Stopplösung</b> (0,5 M Schwefelsäure)	Gebrauchsfertig	farblos	1 x 12 ml
<b>Arbeitsanleitung</b>	...	...	1 Heft
<b>Protokoll mit Sollwertvorgaben</b>	...	...	1 Protokoll

Tab. A4: Reagenzienübersicht der Kitsysteme von IBL. Weiteres Zubehör: Arbeitsanleitung und Qualitätskontrollblatt.

Bezeichnung	Beschreibung	Farbe	Format
<b>Antigen-beschichtete Reagenz-Gefäße</b> (Influenza A/B-typ-spezifische Ribonukleo- und Matrixproteine)	12 Mikrotiterstreifen zu je 8 ver-einzelbaren Reagenzgefäßen im Rahmen; gebrauchsfertig	...	12 x 8
<b>Enzymkonjugat IgG</b>	enthält: anti-humanes IgG konjugiert mit Peroxidase, Proteinpuffer u. Stabilisatoren; gebrauchsfertig	rot gefärbt	1 x 14 ml
<b>Standard A-D</b> (humanes Influenzavirus A/B-IgG)	gebrauchsfertig; enthält PBS <b>Standard A</b> (Negativkontrolle) = 1 U/ml <b>Standard B</b> (Cut-off-Kontrolle) = 10 U/ml <b>Standard C</b> (schwach positive Kontrolle) = 50 U/ml <b>Standard D</b> (Positivkontrolle) = 150 U/ml (IVA) / 175 U/ml (IVB)	hellblau	4 x 2 ml
<b>Verdünnungspuffer</b>	enthält: PBS Puffer, < 0,1% NaN <sub>3</sub> Gebrauchsfertig	hellblau	1 x 60 ml
<b>Waschpuffer</b>	enthält: PBS Puffer; Konzentrat (10x)	farblos	1 x 60 ml
<b>TMB-Substratlösung</b>	Gebrauchsfertig	farblos	1 x 14 ml
<b>TMB-Stopplösung</b>	gebrauchsfertig; 0,5 M Schwefelsäure	farblos	1 x 14 ml
<b>Haftklebefolie</b>	zur Abdeckung der Mikrotiterplatte	...	2 x 1

Tab. A5: Validierungskriterien der Euroimmun-ELISAs.

Validierungskriterien für IVA / IVB - IgG - ELISAs von Euroimmun				
IVA / IVB – ELISA Charge	Kalibrator		Referenzbereich in OD bzw. RE/ml	Valider Bereich in OD bzw. RE/ml
Influenza A				
E110905AO	Kalibrator 1	200 RE/ml	1,253 OD	> 0,700 OD
	Kalibrator 2	20 RE/ml	0,394 OD	> 0,140 OD
	Kalibrator 3	2 RE/ml	0,089 OD	
	Positivkontrolle	quantitativ	115 RE/ml	81 - 150 RE/ml
	Negativkontrolle	quantitativ	2 RE/ml	0 - 15 RE/ml
E120119BO	Kalibrator 1	200 RE/ml	1,162 OD	> 0,700 OD
	Kalibrator 2	20 RE/ml	0,369 OD	> 0,140 OD
	Kalibrator 3	2 RE/ml	0,082 OD	
	Positivkontrolle	quantitativ	117 RE/ml	82 - 152 RE/ml
	Negativkontrolle	quantitativ	2 RE/ml	0 - 15 RE/ml
Influenza B				
E110826AY	Kalibrator 1	200 RE/ml	1,155 OD	> 0,700 OD
	Kalibrator 2	20 RE/ml	0,284 OD	> ,140 OD
	Kalibrator 3	2 RE/ml	0,032 OD	
	Positivkontrolle	quantitativ	98 RE/ml	69 - 127 RE/ml
	Negativkontrolle	quantitativ	4 RE/ml	0 - 15 RE/ml
E110004AO	Kalibrator 1	200 RE/ml	1,272 OD	> 0,700 OD
	Kalibrator 2	20 RE/ml	0,266 OD	> 0,140 OD
	Kalibrator 3	2 RE/ml	0,024 OD	
	Positivkontrolle	quantitativ	83 RE/ml	58 - 108 RE/ml
	Negativkontrolle	quantitativ	5 RE/ml	0 - 15 RE/ml
E120202AG	Kalibrator 1	200 RE/ml	1,272 OD	> 0,700 OD
	Kalibrator 2	20 RE/ml	0,266 OD	> 0,140 OD
	Kalibrator 3	2 RE/ml	0,024 OD	
	Positivkontrolle	quantitativ	83 RE/ml	58 - 108 RE/ml
	Negativkontrolle	quantitativ	5 RE/ml	0 - 15 RE/ml

Tab. A6: Erhobene Merkmale der analysierten Proben von Studien- und Kontrollgruppe.

Statistisch erfasste Merkmale der Studien- und Kontrollgruppe	Spezifizierung
Proben-Identifikations-Nummer	Proben_ID
Probennummer (Ort + Zahl)	Proben_Nr
Zentrum der Probenabnahme	Berlin = B
	Bremen = HB
	Erfurt = EF
	Hannover = H
	Krefeld = KR
	Mannheim = MA
	München = M
	Münster = MU
	Regensburg = R
	Ulm = U
	Wuppertal = W
	Würzburg = WB
Herkunft der Probe	Studiengruppe (Kinder u. Jugendliche) / Kontrollgruppe (Blutspender)
Alter	Jahre [0 - 65]
Geschlecht	männlich / weiblich
NovaTec AK-Befund IVA	negativ / grenzwertig / positiv
NovaTec AK-Konzentration IVA	NTU
NovaTec AK-Befund IVB	negativ / grenzwertig / positiv
NovaTec AK-Konzentration IVB	NTU
Euroimmun AK-Befund IVA	negativ / grenzwertig / positiv
Euroimmun AK-Konzentration IVA	RE/ml
Euroimmun AK-Befund IVB	negativ / grenzwertig / positiv
Euroimmun AK-Konzentration IVB	RE/ml
IBL AK-Befund IVA	negativ / grenzwertig / positiv
IBL AK-Konzentration IVA	U/ml
IBL AK-Befund IVB	negativ / grenzwertig / positiv
IBL AK-Konzentration IVB	U/ml

Tab. A7: Qualitative Antikörperbefunde des NovaTec-ELISAs. Links: IVA; rechts: IVB.

Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
0-2	71 26,1%	18 6,6%	183 67,3%	272 16,3%	0-2	6 2,2%	3 1,1%	263 96,7%	272 16,3%
3-4	103 58,9%	18 10,3%	54 30,8%	175 10,5%	3-4	2 1,1%	3 1,7%	170 97,2%	175 10,5%
5-6	112 74,2%	15 9,9%	24 15,9%	151 9,1%	5-6	4 2,7%	1 0,7%	146 96,6%	151 9,1%
7-8	140 80,0%	13 7,4%	22 12,6%	175 10,5%	7-8	4 2,3%	6 3,4%	165 94,3%	175 10,5%
9-10	155 80,7%	12 6,3%	25 13,0%	192 11,5%	9-10	9 4,7%	10 5,2%	173 90,1%	192 11,5%
11-12	184 91,5%	9 4,5%	8 4,0%	201 12,1%	11-12	16 8,0%	14 7,0%	171 85,0%	201 12,1%
13-14	198 88,4%	13 5,8%	13 5,8%	224 13,5%	13-14	11 4,9%	13 5,8%	200 89,3%	224 13,5%
15-17	225 81,8%	24 8,7%	26 9,5%	275 16,5%	15-17	27 9,8%	19 6,9%	229 83,3%	275 16,5%
<b>Studiengruppe Gesamt</b>	<b>1188 71,4%</b>	<b>122 7,3%</b>	<b>355 21,3%</b>	<b>1665 100,0%</b>	<b>Studiengruppe gesamt</b>	<b>79 4,7%</b>	<b>69 4,2%</b>	<b>1517 91,1%</b>	<b>1665 100,0%</b>
Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
18-29	105 69,5%	15 10,0%	31 20,5%	151 37,8%	18-29	19 12,6%	10 6,6%	122 80,8%	151 37,8%
30-45	81 65,3%	12 9,7%	31 25,0%	124 31,0%	30-45	48 38,7%	19 15,3%	57 46,0%	124 31,0%
46-65	78 62,4%	13 10,4%	34 27,2%	125 31,2%	46-65	60 48,0%	27 21,6%	38 30,4%	125 31,2%
<b>Kontrollgruppe Gesamt</b>	<b>264 66,0%</b>	<b>40 10,0%</b>	<b>96 24,0%</b>	<b>400 100,0%</b>	<b>Kontrollgruppe gesamt</b>	<b>127 31,8%</b>	<b>56 14,0%</b>	<b>217 54,2%</b>	<b>400 100,0%</b>

Tab A8: Qualitative Antikörperbefunde des Euroimmun-ELISAs. Links: IVA; rechts: IVB.

Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
0-2	22 8,1%	7 2,6%	243 89,3%	<b>272</b> <b>16,3%</b>	0-2	24 8,8%	3 1,1%	245 90,1%	<b>272</b> <b>16,3%</b>
3-4	31 17,7%	16 9,1%	128 73,2%	<b>175</b> <b>10,5%</b>	3-4	24 13,7%	10 5,7%	141 80,6%	<b>175</b> <b>10,5%</b>
5-6	57 37,8%	8 5,3%	86 56,9%	<b>151</b> <b>9,1%</b>	5-6	34 22,5%	10 6,6%	107 70,9%	<b>151</b> <b>9,1%</b>
7-8	105 60,0%	17 9,7%	53 30,3%	<b>175</b> <b>10,5%</b>	7-8	65 37,1%	9 5,1%	101 57,8%	<b>175</b> <b>10,5%</b>
9-10	124 64,6%	21 10,9%	47 24,5%	<b>192</b> <b>11,5%</b>	9-10	106 55,2%	14 7,3%	72 37,5%	<b>192</b> <b>11,5%</b>
11-12	152 75,6%	22 11,0%	27 13,4%	<b>201</b> <b>12,1%</b>	11-12	129 64,2%	9 4,5%	63 31,3%	<b>201</b> <b>12,1%</b>
13-14	169 75,5%	22 9,8%	33 14,7%	<b>224</b> <b>13,5%</b>	13-14	166 74,1%	11 4,9%	47 21,0%	<b>224</b> <b>13,5%</b>
15-17	231 84,0%	20 7,3%	24 8,7%	<b>275</b> <b>16,5%</b>	15-17	235 85,5%	6 2,2%	34 12,3%	<b>275</b> <b>16,5%</b>
<b>Studiengruppe Gesamt</b>	<b>891</b> <b>53,5%</b>	<b>133</b> <b>8,0%</b>	<b>641</b> <b>38,5%</b>	<b>1665</b> <b>100,0%</b>	<b>Studiengruppe gesamt</b>	<b>783</b> <b>47,0%</b>	<b>72</b> <b>4,3%</b>	<b>810</b> <b>48,7%</b>	<b>1665</b> <b>100,0%</b>
Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
18-29	144 95,4%	2 1,3%	5 3,3%	<b>151</b> <b>37,8%</b>	18-29	145 96,0%	4 2,7%	2 1,3%	<b>151</b> <b>37,8%</b>
30-45	120 96,8%	3 2,4%	1 0,8%	<b>124</b> <b>31,0%</b>	30-45	122 98,4%	1 0,8%	1 0,8%	<b>124</b> <b>31,0%</b>
46-65	122 97,6%	1 0,8%	2 1,6%	<b>125</b> <b>31,2%</b>	46-65	125 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	<b>125</b> <b>31,2%</b>
<b>Kontrollgruppe gesamt</b>	<b>386</b> <b>96,5%</b>	<b>6</b> <b>1,5%</b>	<b>8</b> <b>2,0%</b>	<b>400</b> <b>100,0%</b>	<b>Kontrollgruppe gesamt</b>	<b>392</b> <b>98,0%</b>	<b>5</b> <b>1,3%</b>	<b>3</b> <b>0,7%</b>	<b>400</b> <b>100,0%</b>

Tab. A9: Qualitative Antikörperbefunde des IBL-ELISAs. Links: IVA; rechts: IVB.

Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
0-2	126 46,5%	27 10,0%	118 43,5%	<b>271</b> <b>16,3%</b>	0-2	13 4,8%	5 1,8%	253 93,4%	<b>271</b> <b>16,3%</b>
3-4	140 80,0%	10 5,7%	25 14,3%	<b>175</b> <b>10,5%</b>	3-4	12 6,9%	6 3,4%	157 89,7%	<b>175</b> <b>10,5%</b>
5-6	135 89,4%	5 3,3%	11 7,3%	<b>151</b> <b>9,1%</b>	5-6	21 13,9%	9 6,0%	121 80,1%	<b>151</b> <b>9,1%</b>
7-8	168 96,0%	3 1,7%	4 2,3%	<b>175</b> <b>10,5%</b>	7-8	37 21,1%	10 5,7%	128 73,2%	<b>175</b> <b>10,5%</b>
9-10	190 99,0%	0 0,0%	2 1,0%	<b>192</b> <b>11,5%</b>	9-10	71 37,0%	17 8,9%	104 54,1%	<b>192</b> <b>11,5%</b>
11-12	201 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	<b>201</b> <b>12,1%</b>	11-12	89 44,3%	28 13,9%	84 41,8%	<b>201</b> <b>12,1%</b>
13-14	223 99,6%	0 0,0%	1 0,4%	<b>224</b> <b>13,5%</b>	13-14	121 54,0%	20 8,9%	83 37,1%	<b>224</b> <b>13,5%</b>
15-17	275 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	<b>275</b> <b>16,5%</b>	15-17	167 60,7%	35 12,7%	73 26,6%	<b>275</b> <b>16,5%</b>
<b>Studiengruppe gesamt</b>	<b>1458</b> <b>87,6%</b>	<b>45</b> <b>2,7%</b>	<b>161</b> <b>9,7%</b>	<b>1664</b> <b>100,0%</b>	<b>Studiengruppe gesamt</b>	<b>531</b> <b>31,9%</b>	<b>130</b> <b>7,8%</b>	<b>1003</b> <b>60,3%</b>	<b>1664</b> <b>100,0%</b>
Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)	Altersgruppen in Jahren	positiv (n) (Prozent)	grenzwertig (n) (Prozent)	negativ (n) (Prozent)	Summe (Prozent)
18-29	150 99,3%	1 0,7%	0 0,0%	<b>151</b> <b>37,8%</b>	18-29	114 75,5%	15 9,9%	22 14,6%	<b>151</b> <b>37,8%</b>
30-45	119 96,0%	4 3,2%	1 0,8%	<b>124</b> <b>31,0%</b>	30-45	116 93,6%	5 4,0%	3 2,4%	<b>124</b> <b>31,0%</b>
46-65	116 92,8%	8 6,4%	1 0,8%	<b>125</b> <b>31,2%</b>	46-65	117 93,6%	4 3,2%	4 3,2%	<b>125</b> <b>31,2%</b>
<b>Kontrollgruppe gesamt</b>	<b>385</b> <b>96,3%</b>	<b>13</b> <b>3,2%</b>	<b>2</b> <b>0,5%</b>	<b>400</b> <b>100,0%</b>	<b>Kontrollgruppe gesamt</b>	<b>347</b> <b>86,8%</b>	<b>24</b> <b>6,0%</b>	<b>29</b> <b>7,2%</b>	<b>400</b> <b>100,0%</b>



Abb. A1: Bewertungsschema diskrepanter Ergebnisse nach Doppelbestimmung (NovaTec).

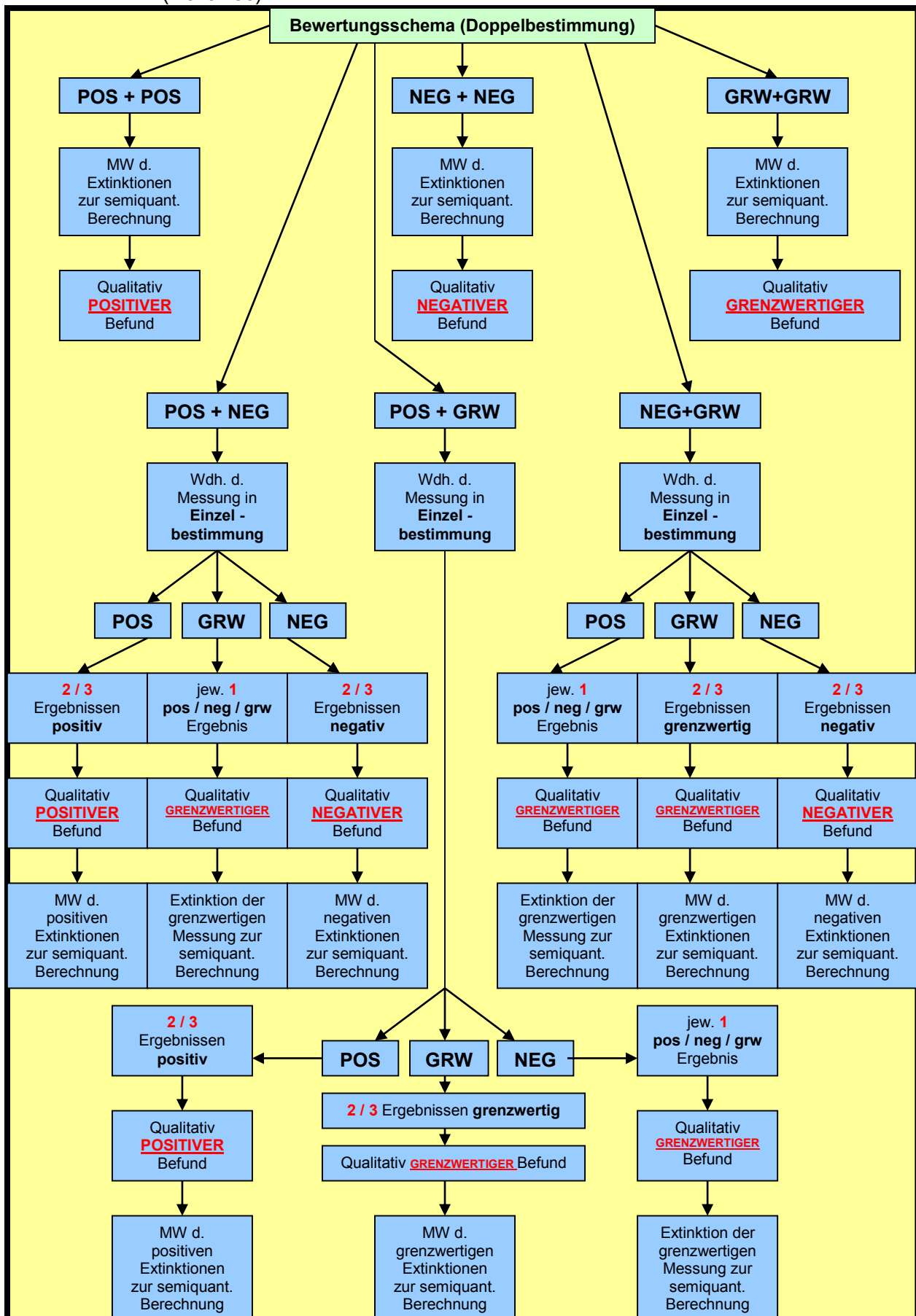
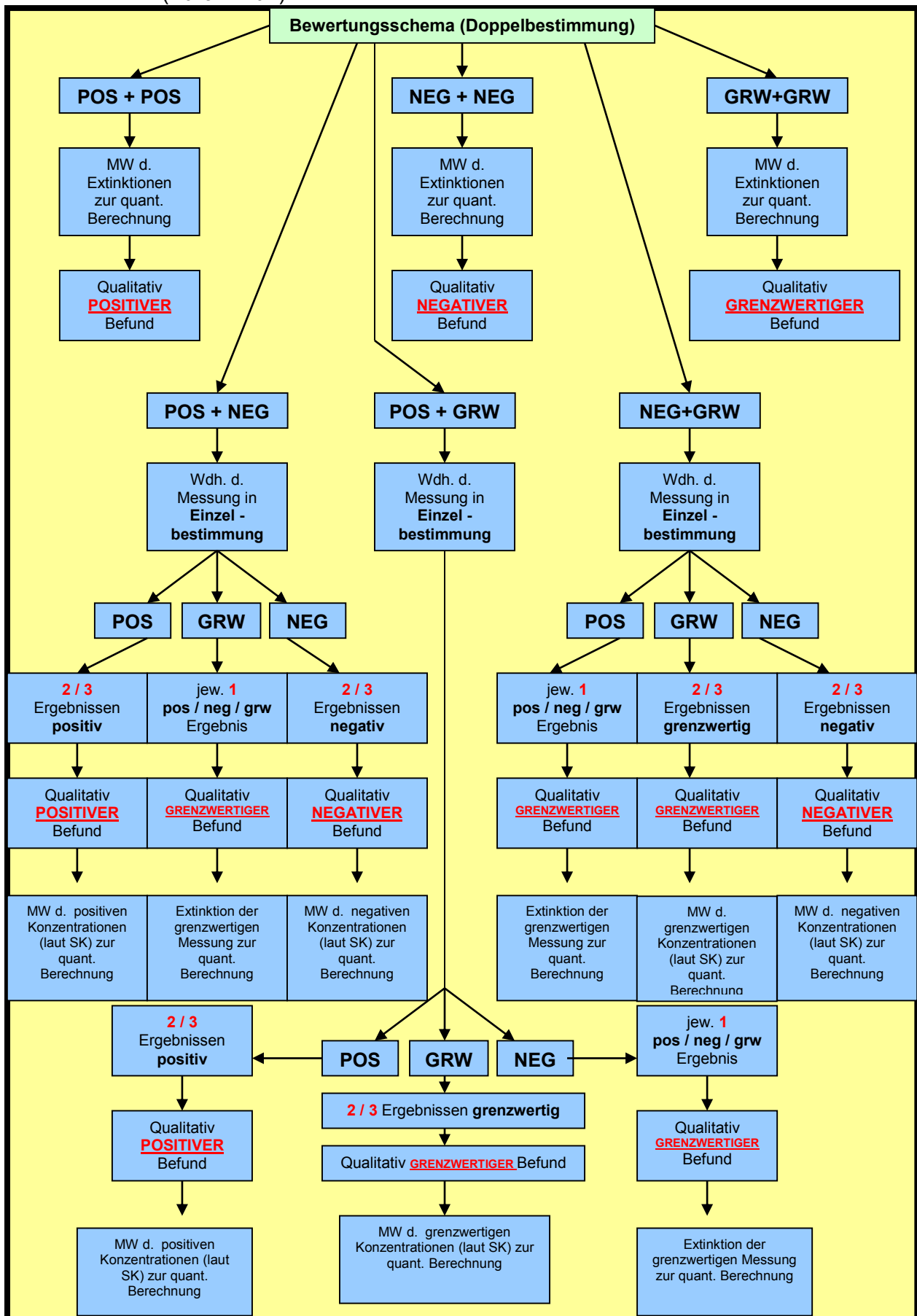


Abb. A2: Bewertungsschema diskrepanter Ergebnisse nach Doppelbestimmung (Euroimmun).



## **Danksagung**

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Sauerbrei, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses interessanten Themas, für die Möglichkeit unter seiner Leitung promovieren zu dürfen und für die Unterstützung meiner Arbeit sowohl bei der Ausarbeitung dieser als auch bei der Bewerbung für mein Promotionsstipendium. Ich bin Ihm außerdem sowohl für die wertvollen Hinweise und Diskussionsansätze im Rahmen der Ausarbeitung meiner Promotion als auch für die Teilhabe seiner jahrelangen Erfahrungen in der virologischen Forschung sehr zu Dank verpflichtet.

Ebenfalls besonders dankbar bin ich meinen unmittelbaren wissenschaftlichen Mitarbeitern am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena, Frau Monika Alexi und Frau Christa Rothmann, für Ihre Unterstützung bei meiner Arbeit im Labor. Durch Ihre Hilfe erlernte ich schnell die notwendigen diagnostischen Methoden und den Umgang mit den Proben und den Geräten und konnte schnell selbständig meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im Institut nachgehen.

Darüber hinaus möchte ich dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung für den Erhalt eines zwölfmonatigen Promotionsstipendiums danken, das es mir auch in finanzieller Hinsicht erlaubte, meine Promotion so zu vollenden.

Frau Brandstädt und Frau Dietrich vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation des Universitätsklinikums Jena danke ich ebenfalls für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern, meiner Familie und meiner Freundin, die mich während der Zeit der Promotion immer unterstützten und motivierten. Durch ihr Vertrauen konnte ich mit dem nötigen Rückhalt die nötige Ausdauer und Energie aufbringen, meine Promotion in dieser Form abzuschließen.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Andreas Sauerbrei

Frau Christa Rothmann

Frau Monika Alexi

Frau Antje Brandstädt

Frau Christine Dietrich,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift des Verfassers

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Tobias Langenhan  
 Geboren am: 31.03.1987 in Hildburghausen  
 Familienstand: ledig  
 Wohnhaft in: 98630 Römhild OT Simmershausen, Rother Weg 4

### Schul Ausbildung

1993 – 1997 Grundschule Bedheim  
 1997 – 2003 Staatliche Regelschule Gleichamberg / Straufhain  
 Abschluss: Realschulabschluss (Gesamtnote 1,0)  
 2003 – 2006 SBZ Hildburghausen, Berufliches Gymnasium  
 Abschluss: Abitur (Gesamtnote 1,4)

### Zivildienst

07/2006 – 03/2007 Medical Park, Bad Rodach

### Studium

10/2007 – 09/2009 Vorklinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Universitätsklinikum Jena)  
 09/2009 1.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 3,0)  
 10/2009 – 07/2013 Klinisches Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Universitätsklinikum Jena)  
 08/2013 – 07/2014 Praktisches Jahr (1.Tertial: Anästhesiologie und Intensivmedizin am UKJ; 2.Tertial: Chirurgie am UKJ; 3.Tertial: Innere Medizin am Klinikum Meiningen)  
 vorauss. 12/2014 2.Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

### Stipendium

10/2011 – 09/2011 Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der FSU